

**Isolierung, Strukturaufklärung und Untersuchungen zur Synthese  
von Sekundärmetaboliten aus Pilzen und Pflanzen**

Vom Fachbereich Chemie und Chemietechnik  
der Universität-Gesamthochschule Paderborn  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

von  
**Klaus Steingröver**  
aus  
Verl

**PADERBORN 2001**

1. Referent: Prof. Dr. K. Krohn  
2. Referent: Prof. Dr. G. Fels

Eingereicht am: 26.09.2001  
Mündliche Prüfung: 17.10.2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom August 1998 bis September 2001 im Fachbereich Chemie und Chemietechnik der Universität-Gesamthochschule Paderborn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Krohn angefertigt.

Herrn Prof. K. Krohn danke ich für die interessante Themenstellung sowie die gewährte Freizügigkeit bei der Bearbeitung der Thematik. Desweiteren haben seine Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. G. Fels danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Weiterhin danke ich Frau B. Várkondi und den Herren D. Gehle und J. Vitz für die konstruktive Zusammenarbeit und die vielen heiteren Stunden im Labor. Den anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aller Arbeitskreise der Organischen Chemie danke ich für das kollegiale und angenehme Arbeitsklima.

Meinen Eltern  
in Dankbark

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1. Pilze.....	1
1.2. Primär- und Sekundärmetabolismus .....	3
1.3. Pflanzenschutzmittel .....	4
1.4. Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	10
<b>2. HAUPTTEIL .....</b>	<b>12</b>
2.1. Naturstoffisolierung und Strukturaufklärung .....	12
2.1.1. Stamm 4567.....	12
2.1.2. Stamm 3304.....	23
2.1.3. Stamm 4689.....	25
2.1.4. Stamm 5451.....	28
2.1.5. Naturstoffe aus Pflanzen .....	39
2.2. Ermittlung der absoluten Konfiguration mittels quantenchemischer Berechnung des Circular dichroismus (CD).....	43
2.2.1. Allgemeines.....	43
2.2.2. Berechnung der CD-Spektren und Aufklärung der absoluten Konfiguration.....	45
2.2.3. Berechnung der absoluten Konfiguration der Preussomerine G – L.....	47
2.2.4. Berechnung der absoluten Konfiguration der Xyloketale A und D.....	53
2.2.5. Berechnung der absoluten Konfiguration der Palmarumycine C <sub>9</sub> , C <sub>10</sub> und C <sub>12</sub> ...	57
2.3. Synthesen.....	62
2.3.1. Erste Syntheseschritte zur Darstellung von Stemphyperylenol .....	62
2.3.2. Syntheseversuch zur Darstellung des Pyrancarbonsäureesters .....	66
<b>3. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>69</b>
<b>4. EXPERIMENTELLER TEIL.....</b>	<b>72</b>
4.1. Allgemein verwendete Analyse- und Meßmethoden.....	72

<b>4.2. Mikrobiologische Arbeitsmethoden.....</b>	<b>74</b>
4.2.1. Anreicherung der Pilze in Submerskultur .....	75
<b>4.3. Experimenteller Teil zur Naturstoffisolierung .....</b>	<b>75</b>
4.3.1. Substanzcharakteristika der Naturstoffe aus dem Pilzstamm 4567.....	75
4.3.2. Substanzcharakteristika des Naturstoffs aus dem Pilzstamm 3304.....	82
4.3.3. Substanzcharakteristika des Naturstoffs aus dem Pilzstamm 4689.....	84
4.3.4. Substanzcharakteristika der Naturstoffe aus dem Pilzstamm 5451.....	85
4.3.5. Naturstoffe aus Pflanzen .....	91
<b>4.4. Experimenteller Teil zur Naturstoffsynthese des Stempherylenols .....</b>	<b>93</b>
4.4.1. 2,6-Dihydroxyanthracen (32) .....	93
4.4.2. 2,6-Dipropoxyanthracen (33) .....	94
4.4.3. 1,5-Diacetyl-2,6-dipropoxyanthracen (34).....	95
4.4.4. 1,5-Diacetyl-2,6-dipropoxy-9,10,11,12-tetrahydro-9,10-[1,3]dioxolo[4,5]- ethenoanthracen-14-on (35) .....	96
4.4.5. 1,5-Diacetyl-2,6-dipropoxy-9,10-dihydro-9,10-ethano-11,12- anthracendiol (36).....	97
4.4.6. 1,5-Diacetyl-2,6-dipropoxy-9,10-dihydro-anthracen-9,10-dicarbaldehyd (37) ...	98
4.4.7. 4-Chlor-[1,3]dioxolan-2-on (40) .....	98
4.4.8. Vinylencarbonat (38).....	99
<b>4.5. Experimenteller Teil zur Darstellung des Pyrancarbonsäureesters.....</b>	<b>100</b>
4.5.1. 2,2-Dimethyl-[1,3]dioxan-4,6-dion (42) .....	100
4.5.2. 5-(1'-Hydroxy-3'-oxobutylidene)-2,2-dimethyl-[1,3]dioxan-4,6-dion (44) .....	100
4.5.3. 4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -pyran-3-carbonsäure(45).....	101
4.5.4. 2,2,7-Trimethylpyrano[4,3-d][1,3]dioxin-4,5-dion (46) .....	102
<b>5. ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>103</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1. Pilze**

Die Bezeichnung für die Pilze leitet sich von ihren auffälligsten Vertretern, den Hutpilzen (lat. Fungus; gr. Mykes), her. Im weiteren Sinne ist dieses eine Bezeichnung für eine Gruppe Chlorophyll-freier, heterotropher, eukaryotischer Organismen. Bis heute sind mehr als 60000 Arten beschrieben. Schätzungen zufolge soll dies aber erst ein Viertel der tatsächlich Existierenden sein<sup>[1]</sup>.

Als Eukaryonten verfügen sie wie Tiere und Pflanzen über einen echten Zellkern, der das genetische Material in Form von Chromosomen enthält, sowie über typische Zellorganellen im Protoplasma. Verglichen mit den Pflanzen weisen die Pilze einen nur sehr geringen Grad an morphologischer Differenzierung und nahezu keine Arbeitsteilung auf<sup>[2]</sup>. Pilze kommen als Saprophyten, Symbionten und Parasiten vor. Diese Einteilung ist jedoch fließend, weil ein symbiotisch wachsender Pilz im Laufe seiner Entwicklung zum Parasiten werden kann. Die saprophytischen Pilze kommen in und auf abgestorbenen organischen Substraten vor und beziehen hieraus die notwendigen Kohlenstoffverbindungen durch oxidativen Abbau. Biotrophe Pilze benötigen zu ihrer Existenz als Symbionten oder Parasiten Pflanzen, Tiere, Algen, Protozoen oder Bakterien.

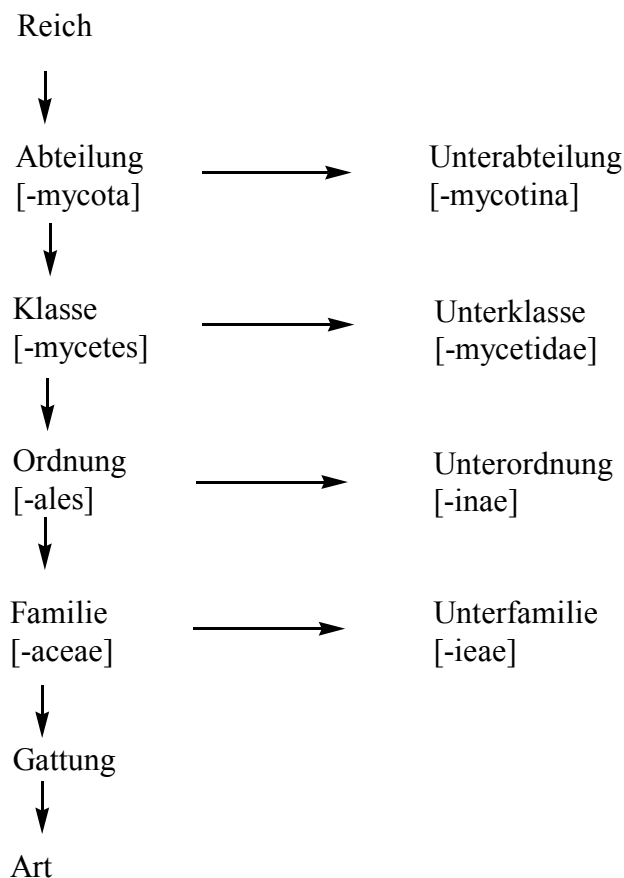
Flechten (*Lichenes*) sind stabile symbiontische Assoziationen von Pilzen mit photosynthetisch aktiven Mikroorganismen. Der Pilzpartner wird Mykobiont, der phototrophe Partner, meist Grünalgen oder Cyanobakterien, Phykobiont genannt. Durch die Symbiose stehen Syntheseprodukte und Organe des einen Partners auch für den anderen zur Verfügung. Die Aufnahme von Wasser und gelösten Substanzen aus der Umgebung erfolgt durch den Pilz. Die Algen stellen immer die Nahrung für den Pilz bereit. Die Cyanobakterien fixieren zudem Luftstickstoff.

Zu der chemoorganoheterotrophen (C-heterotrophen) Ernährung sind die Pilze durch eine Vielzahl von Enzymen befähigt. Neben den Oxidasen gehören dazu beispielsweise die Amylasen, Lipasen, Trehalasen und Peptidasen.

Der Entwicklungszyklus beginnt generell mit haploiden Mycelien. Bei jungen Organismen ist die Fortpflanzung üblicherweise asexuell, bei älteren sexuell. Die sexuelle Reproduktion ist eine Aufeinanderfolge von Plasmogamie, d. h. die Verschmelzung des Cytoplasmas zweier

Zellen, und Karyogamie (Verschmelzung der Zellkerne). Dazwischen befindet sich eine dikaryotische Phase mit zwei haploiden Zellkernen. Durch die Karyogamie bildet sich eine diploide Zelle, die sich in der Regel recht bald meiotisch teilt. Dabei werden haploide Sporen gebildet durch deren räumliche Verbreitung und anschließender Keimung Pilze an anderen Orten gebildet werden<sup>[3]</sup>.

Die Taxonomie unterteilt die Pilze in drei Hauptabteilungen. Grundlage für die Einteilung ist die Vielfalt an Formen der Fortpflanzungsstrukturen. Die in der Klassifizierung angewandten Gruppierungen sind in Abbildung 1 dargestellt<sup>[4]</sup>.



**Abb. 1:** Klassifizierung der Pilze. In Klammern sind die systematischen Namensendungen angegeben

Die drei Abteilungen gliedern die Pilze in Zygomycota (Jochpilze), Ascomycota (Schlauchpilze) und Basidiomycota (Ständerpilze). Deuteromycota oder *fungi imperfecti* sind echte Pilze, die nur nach ihren asexuellen Zuständen beurteilt werden, deren Entwicklung aber unvollständig oder nur teilweise bekannt ist.



Anhand des Kiefernzapfenrüblings (*Strobilurus tenacellus*) soll die Klassifizierung beispielhaft gezeigt werden. Nach dem „National Center of Biotechnology Information“ Bethesda, Maryland USA ist die Einteilung wie folgt:

Er gehört zum Reich der Fungi, zur Abteilung der Basidiomycota, Klasse der Homobasidiomycetes, Ordnung der Agaricales, Familie der Tricholomataceae, Gattung der *Strobilurus*; die Art ist dann schließlich *tenacellus*. Zur Benennung hat jede Pilzart nach den internationalen Nomenklaturregeln einen zweigliedrigen Namen, dessen erste Komponente die Gattung bezeichnet die zweite die Art; der Name des Kiefernzapfenrüblings ist nach den Nomenklaturregeln somit *Strobilurus tenacellus*.

Schimmelpilze, Hefen, Flechten und Mykorrhiza (Symbiose zwischen Pilzen und Pflanzenwurzeln) hingegen sind keine Abteilungen oder Klassifizierungskriterien der Pilze. Sie repräsentieren verschiedene Lebensformen, die sich unabhängig in allen Pilzabteilungen entwickelten<sup>[3]</sup>.

Als pilzähnliche Protisten werden die sechs phylogenetisch voneinander unabhängigen Abteilungen Mycomycota, Plasmodiophoromycota, Labyrinthulomycota, Oomycota, Hyphochytriomycota und Chytridiomycota zusammengefasst. In jeder Abteilung kommen aktive bewegliche Keime vor, am häufigsten Zoosporen, manchmal amöboide Zellen oder beides. Teile der meisten Abteilungen haben sich, wie die echten Pilze als Ganzes, zu Festlandbewohnern entwickelt<sup>[4]</sup>.

## 1.2. Primär- und Sekundärmetabolismus

Der Stoffwechsel (Metabolismus) wird in zwei Bereiche unterteilt. Zum einen ist dies der Primärmetabolismus, der auf die Erhaltung und Vermehrung des Lebens ausgerichtet ist. Zum anderen gibt es den Sekundärmetabolismus, der einen eigenständigen Bereich des Gesamtstoffwechsels darstellt. Der Sekundärstoffwechsel wird in Ruhephasen oder unter Limitierung verstärkt<sup>[5]</sup>.

Zum Primärmetabolismus gehören die grundlegenden Stoffwechselprozesse im Zusammenhang mit Wachstum, Energieerzeugung und -transformation sowie dem Umsatz der Körper- und Zellbestandteile. Die Grundprinzipien, Reaktionen und Produkte dieses Stoffwechsels sind bei allen Lebewesen nahezu identisch. Primärmetabolite sind Aminosäuren, Proteine, Purin- sowie Pyrimidinbasen, Nucleotide, Nucleinsäuren, Zucker, Fettsäuren, Intermediate der Glycolyse, des Tricarbonsäure-Zyklus u. a.

Der Sekundärmetabolismus knüpft sich häufig an den Primärstoffwechsel an und ist im Gegensatz zu diesem von Lebewesen zu Lebewesen unterschiedlich. Die Biosynthese von bestimmten Sekundärmetaboliten beschränkt sich meist auf einige wenige Arten. Trotz der großen chemischen Vielfalt werden diese aus relativ wenigen Vorstufen gebildet. In Tabelle 1 ist die Beziehung zwischen einigen Primär- und Sekundärmetaboliten aufgelistet<sup>[5]</sup>.

**Tabelle 1:** Beziehung zwischen Primär- und Sekundärmetaboliten

Primärmetabolite	Sekundärmetabolite
Zucker	Inositole, Uronsäuren
Acetat/Malonat	Polyketide
Shikiminsäure	Chinone, Chinolinalkaloide
Aminosäuren	Amine, Hydroxamsäuren
Phenylpropanaminosäuren	Lignin, Lignane
Isopentenylpyrophosphat	Terpene, Steroide
Porphyrine	Gallenfarbstoffe

Viele der Substanzen, die durch den Sekundärstoffwechsel gebildet werden, haben keine offensichtliche biologische Funktion. Andere haben für den produzierenden Organismus grundlegende Bedeutung. Sie prägen das äußere Erscheinungsbild durch Farbstoffe, dienen als Lockstoffe, Antifraßmittel, verwerten Zwischenprodukte des Primärstoffwechsels u.a.

Die Vielfältigkeit der Sekundärmetabolite und ihre teilweise sehr speziellen biologischen Eigenschaften machen sie zu interessanten Untersuchungsobjekten bei der Wirkstoffentwicklung von Pharmaka und Pflanzenschutzmitteln.

### 1.3. Pflanzenschutzmittel

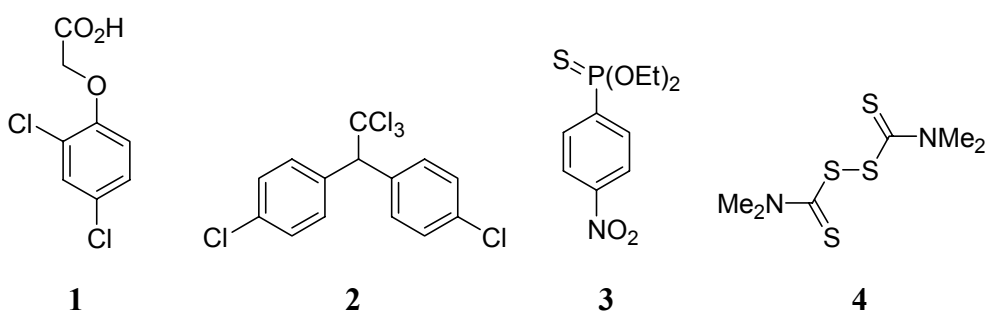
Im Sinne des Pflanzenschutzgesetzes (§ 2, PflSchG) sind Pflanzenschutzmittel „Stoffe, die dazu bestimmt sind:

- a) Pflanzen oder Pflanzenerzeugnisse vor Schadorganismen zu schützen,

- b) Pflanzen oder Pflanzenerzeugnisse vor Tieren, Pflanzen oder Mikroorganismen zu schützen, die nicht Schadorganismen sind,  
 c) die Lebensvorgänge von Pflanzen zu beeinflussen, ohne ihrer Ernährung zu dienen (Wachstumsregler),  
 d) das Keimen von Pflanzenerzeugnissen zu hemmen,  
 ausgenommen sind Wasser, Düngemittel im Sinne des Düngemittelgesetzes und Pflanzenstärkungsmittel; als Pflanzenschutzmittel gelten auch Stoffe, die dazu bestimmt sind, Pflanzen abzutöten oder das Wachstum von Pflanzen zu hemmen oder zu verhindern, ohne dass diese Stoffe unter Buchstabe a oder c fallen.“

Die ersten brauchbaren Pflanzenschutzmittel wie die Bordeaux-Brühe, waren Zufallsentdeckungen. Dieses Mittel wurde erstmals von Millard 1885 beschrieben. Die Bordeaux-Brühe ist eine Bezeichnung für eine aus gebrannten Kalk und wässriger Kupfersulfatlösung erhaltene Suspension und wurde zuerst gegen den Falschen Mehltau *Plasmopara viticola* an Weinreben angewendet<sup>[6]</sup>. Es handelte sich bei den ersten Pflanzenschutzmitteln meist um anorganische Substanzen, die größtenteils unselektiv, nur in hohen Aufwandmengen wirksam und häufig toxisch waren.

Eine planmäßige industrielle Forschung mit dem Ziel der Auffindung mindertoxischer und selektiver organisch-chemischer Wirkstoffe für die Anwendung als Pflanzenschutzmittel begann in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts. Grundlage hierfür war das Bedürfnis, die landwirtschaftlichen Erträge gegen den Einfluss von Schadorganismen zu schützen und den Bedarf einer zunehmenden Weltbevölkerung an Lebensmitteln zu sichern. Die ersten Vertreter dieser Entwicklung waren u.a. 2,4-D (1), DDT (2), E605 (3) und Thiram (4)<sup>[7]</sup>.



**Abb. 2:** Erste organische Pflanzenschutzmittel 2,4-D (1), DDT (2), E605 (3), Thiram (4)

DDT (2) war jahrzehntelang das wichtigste Insektizid. Es wurde auch zur Bekämpfung der Malaria übertragenden Stechmücken (*Anopheles*-Arten) eingesetzt. Durch das Anti-Malaria-Programm der WHO wurde diese Krankheit in vielen tropischen Ländern sogar nahezu aus-

gerettet. Das Auftreten von Resistenz bei einigen Insektenarten sowie Berichte, dass DDT bei Mäusen Leberkrebs auslöse und im Fettgewebe von Warmblütern gespeichert werde und auch die Angst vor einer Anreicherung von DDT in der Umwelt führten dazu, dass die Produktion und Anwendung nach und nach in fast allen Industrieländern verboten wurde. Das Buch „Silent Spring“ von Carson trug zur Sensibilisierung der Öffentlichkeit für die Nebenwirkungen und Folgen des Einsatzes von Pestiziden in der Landwirtschaft bei<sup>[8]</sup>.

Über die ersten Pflanzenschutzmittel, die in der Praxis eingesetzt wurden, war meist nur die chemische Struktur und die beobachtete nützliche Wirkung bekannt. Heute gehen der Markteinführung umfangreiche Untersuchungen voraus. Es wird versucht, einen „gläsernen“ Wirkstoff zu produzieren. Erforscht werden<sup>[9]</sup>:

- Wirkungsmechanismus
- Aufnahme
- Transport
- Abbau in Wasser, Boden und Luft
- Metaboliten (Pflanze und Tier)
- Rückstände
- Toxizität
- Effekte auf Nicht-Zielorganismen

Einzelheiten des Zulassungsverfahrens in der BRD regelt die Verordnung über Pflanzenschutzmittel und Pflanzenschutzgeräte (Pflanzenschutzmittelverordnung).

Heute hat die Pflanzenschutzmittelindustrie ein Marktvolumen von etwa 30 Milliarden US-\$ pro Jahr<sup>[10]</sup>. Die Entwicklung eines neuen Pflanzenschutzmittels dauert zwischen 8 und 12 Jahre und kostet etwa 250 bis 300 Millionen DM<sup>[7]</sup>. Daraus ergibt sich, dass die Einführung neuer Wirkstoffe mit einer Verdrängung alter, bereits am Markt etablierter einhergeht. Dieses kann nur geschehen, wenn das neue Präparat für den Anwender „besser“ ist. Hiermit ist entweder ein kostengünstigerer Einsatz, resistenzbrechende Eigenschaften, geringere Aufwandmenge u. a. gemeint.

Am Anfang der Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel steht die Leitstruktur. Dieses ist eine Verbindung aus der Synthese oder dem Naturstoffpool, die in relevanten biologischen Tests eine verfolgenswerte Wirkung aufweist.

In der Arzneimittelforschung wird seit einigen Jahren die biologische Aktivität verschiedener Substanzen an Targets (Enzymen, Rezeptoren oder Ionenkanälen) geprüft. Durch das High-Throughput-Screening können so mehrere 100000 Substanzen in einem Assay in wenigen Tagen begutachtet werden. Diese Methode wird auch in der chemischen Pflanzenschutzfor-

schung eingesetzt<sup>[7]</sup>. In dieser Forschungsrichtung werden aber auch weiterhin Testreihen am kompletten Organismus durchgeführt. Zum einen sind die Zielorganismen Pflanze, Pilz und Insekt leicht und relativ günstig massenhaft reproduzierbar und unterliegen keinen besonderen Einschränkungen. Zum anderen können so gleich die Einflüsse durch die Aufnahme, den Transport und den Metabolismus miterfasst werden. Außerdem ist der Durchsatz des In-vivo-Screenings – dank Automatisierung – deutlich höher und kann dem Gewächshaustest vorge-schaltet werden.

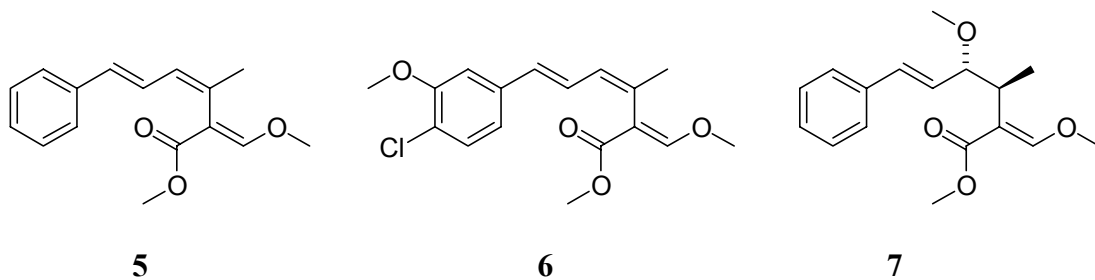
Ist auf diesem Wege eine Leitstruktur identifiziert worden, so beginnt die Leitstrukturoptimierung, die die Einführung eines neuen Wirkstoffes am Markt zum Ziel hat.

Dabei entsprechen die Leitstrukturvariationen den Mutationen einer natürlichen Evolution. Sowohl bei der Variation als auch bei der Selektion müssen optimale Kompromisse hinsichtlich aller Stoffeigenschaften gefunden werden. Das wesentliche rückkoppelnde Steuerungselement hierbei sind die Struktur-Wirkungsbeziehungen. Bei der Optimierung wird auch das Molecular Modeling genutzt. Weitere Computer-basierende Methoden zur Verbesserung der Leitstruktur ist das QSAR-Tool (quantitative structure-activity relationship) und die Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) die zur Abschätzung der biologischen Wirkung neuer Strukturvorschläge genutzt werden<sup>[11,12]</sup>.

Als letzter Schritt vor der Markteinführung steht die geeignete Formulierung und Applikation. Hier wird die Forschung unter den Gesichtspunkten einer verbesserten Bioverfügbarkeit, einer geringeren Anwendergefährdung und einer geringeren Umweltbelastung betrieben. Der Trend geht hier zu den Suspensionskonzentraten und wasserdispergierbaren Pulvern. Ein weiterer Formulierungstyp ist die Saatgutbeize. Diese zeichnet sich durch die geringe Flächenbelastung aus, da der Wirkstoff sich schließlich nur direkt an der Saat befindet.

Eine Wirkstoffklasse der jüngeren Vergangenheit, die durch Optimierung einer Leitstruktur aus dem Naturstoffscreening hervorgegangen ist, sind die Methoxyacrylate (Strobilurine). Die Entwicklung soll hier kurz vorgestellt werden.

Die Strobilurine wurden bei einer Ende 1976 begonnenen Suche nach neuen antibiotisch wirksamen Substanzen aus Basidiomyceten isoliert und identifiziert<sup>[13]</sup>. Unter den ersten Antibiotika, die dabei entdeckt wurden, waren die Strobilurine A (**5**) und B (**6**) aus Kulturen des Kiefernzapfenröhlings *Strobilurus tenacellus*<sup>[14]</sup>.

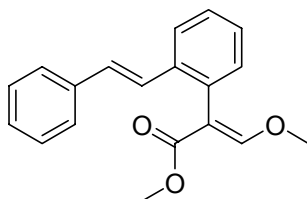


**Abb. 3:** Strobilurin A (5), Strobilurin B (6) und Oudemansin A (7)

Chemisch gesehen handelt es sich um Derivate der  $\beta$ -Methoxyacrylsäure. Eng verwandt mit den Strobilurinen sind die Oudemansine. In Abbildung 3 ist Oudemansin A (7) dargestellt. Pilze, die diese Sekundärmetabolite bilden, sind weltweit in allen Klimazonen anzutreffen. Untersuchungen zur Wirkungsweise ergaben, dass Strobilurine und Oudemansine die Atmung von Pilzen hemmen. Sie binden reversibel an das Ubihydrochinon-Oxidations(Qp)-Zentrum des mitochondrialen  $bc_1$ -Komplexes und führen damit zu einer Inhibierung des Elektronentransfers<sup>[15]</sup>.

Bereits 1977 wurde damit begonnen, Molekülvarianten von Strobilurin A zu synthetisieren, um leicht zugängliche Analoga mit ähnlicher oder verbesserter Wirkung zu erhalten<sup>[16]</sup>. Aus diesen Arbeiten konnten erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abgeleitet werden. Die *E*-Konfiguration des Methoxyacrylats ist demnach essentiell für die Wirkung.

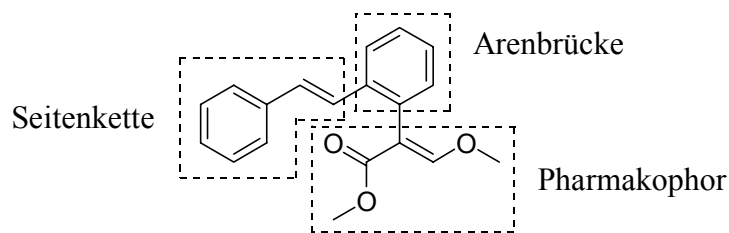
In-vivo Tests von 5 an pilzinfizierten Pflanzen im Gewächshaus zeigten enttäuschende Ergebnisse. Als Grund hierfür wurde die photolytische und/oder die oxidative Labilität des Triensystems des Naturstoffs angenommen. Zur Stabilisierung des Systems wurde das „Enoletherstilben“ (8) synthetisiert<sup>[17]</sup>.



**Abb. 4:** Enoletherstilben (8)

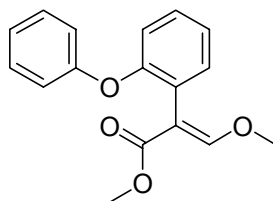
Das Stilben 8 zeigte gegenüber Strobilurin A eine zehnfach höhere Aktivität bei der Atmungshemmung gegen *P. notatum* und auch die Tests an pilzinfizierten Pflanzen im Gewächshaus zeigten deutlich bessere Resultate.

Für das weitere Design wurde die Leitstruktur in drei Molekülregionen eingeteilt: Seitenkette, Arenbrücke und Pharmakophor wie in Schema 1 zu sehen ist<sup>[13]</sup>.



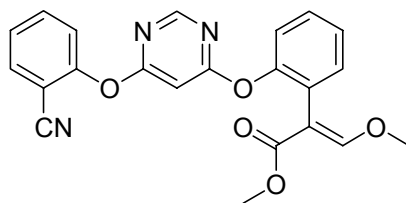
**Schema 1:** Regionen der Enoletherstilben-Leitstruktur

1986 wurde ein Patent von der ICI veröffentlicht, worin diese Anspruch auf den Diphenylether (**9**) und ähnliche Verbindungen anmeldete<sup>[18]</sup>. Die Leitstruktur, aus dem der Ether **9** entwickelt wurde war das Oudemansin A (**7**).



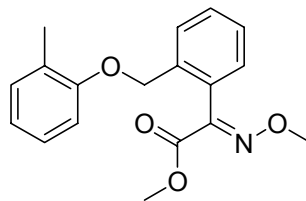
**Abb. 5:** Diphenylether (**9**)

Dieser hatte gegenüber den Enoletherstilben (**8**) eine deutlich bessere Photostabilität, im Freilandtest ein breites Wirkungsspektrum und er besitzt eine systemische Beweglichkeit im wässrigen Saftstrom der behandelten Pflanzen. Diese Beweglichkeit führt dazu, dass der Wirkstoff nach der Applikation in die Pflanze penetriert und dort in gelöster Form transportiert wird. Hierdurch kommt es zu einer Wirkung an Stellen der Pflanze, die nicht direkt behandelt wurden. Die weitere Optimierung des Diphenylethers (**9**) durch Einfügung hydrophiler Elemente in der Seitenkette führte schließlich zu Azoxystrobin (**10**). Diese Verbindung wurde von Zeneca unter der Internationalen Kurzbezeichnung (common name) Azoxystrobin 1996 in Deutschland unter den Handelsnamen Amistar am Markt eingeführt<sup>[13]</sup>.



**Abb. 6:** Azoxystrobin (**10**)

Zeitgleich führte die BASF Forschungsarbeiten zur Leitstrukturoptimierung von **8** durch. Wegen der Patentanmeldung von ICI mussten hierbei Änderungen vorgenommen werden. Man entschied sich dort den Pharmakophor abzuwandeln. Die Enolether-Einheit wurde durch eine Oximether-Einheit ersetzt. Es zeigte sich, dass diese neue Einheit am Wirkort keine Aktivitätsunterschiede zum ursprünglichen Pharmakophor aufweist. Diese abgeänderte Form war die Grundlage, aus der Präparat **11** entwickelt wurde, welches als Kresoxim-methyl ebenfalls 1996 am Markt eingeführt wurde.



**Abb. 7:** Kresoxim-methyl (**11**)

**10** und **11** sind in wichtigen Kulturen wie Getreide, Reis, Wein, Obst und Gemüse gegen ein breites Spektrum von Pilzen flexibel einsetzbar.

## 1.4. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Trotz aller Fortschritte auf den Gebieten der Wirkstoffentwicklung im Pflanzenschutz und in der Pharmaforschung besteht nach wie vor ein großer Bedarf an neuen Wirkstoffen. Dies bezieht sich in der Pflanzenschutzchemie insbesondere auf Verbindungen, die ökologisch verträglich, selektiv wirksam, kostengünstig und vor allem resistenzbrechend sind.

Da in der Pharmaforschung wieder mehr der Zufall als Pate steht für die Leitstruktur-generierung, besteht nun ein großer Bedarf an neuen Substanzen zur Testung.

Eine Lösung dieses Problems ist die parallele Synthese und die kombinatorische Chemie, mittels derer in kurzer Zeit ganze Substanzbibliotheken erzeugt werden können. Die andere ist die Naturstoffisolierung. Hier werden trotz langer intensiver Forschung immer noch neue, hochwirksame Substanzen aus den unterschiedlichsten Organismen gewonnen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit lässt sich in drei Teilbereiche gliedern:

- a) Isolierung, Charakterisierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Pilzen und Pflanzen.



b) Bestimmung der absoluten Konfiguration einiger Naturstoffe mittels quantenchemischer Methoden.

c) Synthese biologisch wirksamer Metabolite.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Forschungsprojektes „Molekulare Wechselwirkungen zwischen Targets und Naturstoffen als Werkzeuge zur Identifizierung neuer Wirkstoffe und Wirkmodelle für den Pflanzenschutz und Pharma“ in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. P. Aust am Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig und der BASF AG, Ludwigshafen durchgeführt.

Die Auswahl, Aufzucht und Kultivierung der Pilze sowie erste Untersuchungen der biologischen Aktivität der Rohextrakte und der Naturstoffe wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Aust unter Leitung von Frau Dr. Schulz im Institut für Mikrobiologie in Braunschweig durchgeführt. Die taxonomische Bestimmung der untersuchten Pilzstämme führte Dr. Draeger durch. Für die weiterführende Testung der isolierten Naturstoffe war die BASF AG verantwortlich.

## 2. Hauptteil

### 2.1. Naturstoffisolierung und Strukturaufklärung

#### 2.1.1. Stamm 4567

##### 2.1.1.1. Pilzbeschreibung

Der Pilz 4567 ist ein Endophyt, er wurde aus einer Distel (*Cirsium arvense*) in Niedersachsen isoliert. Es handelt sich hierbei um ein *Mycelia sterila* und kann daher taxonomisch nicht genauer identifiziert werden.

##### 2.1.1.2. Isolierung der Naturstoffe

Der Endophyt 4567 wurde in je 12 Fernbachkolben auf Malz-Soja-Weichagar und Biomalzagar 130 Tage lang kultiviert. Im Anschluss folgte die Extraktion mit Petrolether (einmal) und mit Essigsäureethylester (dreimal). Die organischen Phasen wurden eingeeengt und der Rückstand in einem Lösungsmittelgemisch aus Aceton und Methanol (1 : 1) aufgenommen. Die Rohextrakte dieses Pilzstammes zeigten in den verschiedenen Agardiffusionstest folgende Aktivitäten:

**Tabelle 2:** Agardiffusionstest des Rohextraktes 4567

Medium	Fraktion	Ec	Bm	Ust	Eur	Mm	Fu	Chl
Bio	PE	0	0	2.0	0.2	1.5	0	0.8
	E	0	0.3	2.0	0.8	1.0	0	0.6
M/S	PE	0	0.3	0	0	0	0	0
	E	0.2	0.3	0.4	0	0	0	0.5

Die Zahlen geben die Größe der Hemmhöfe in cm an.

Die beiden Extrakte, die aus der Kultivierung auf Biomalzagar gewonnen wurden, zeigten eine gute Wirkung gegen *Ustilago violacea* (Ust) und *Mycothypha microspora* (Mm). Die Extrakte der Kultivierung auf Malz/Soja-Weichagar zeigten, wie der Tabelle 2 zu entnehmen ist, eine deutlich schlechtere Wirkung gegen die Testorganismen.

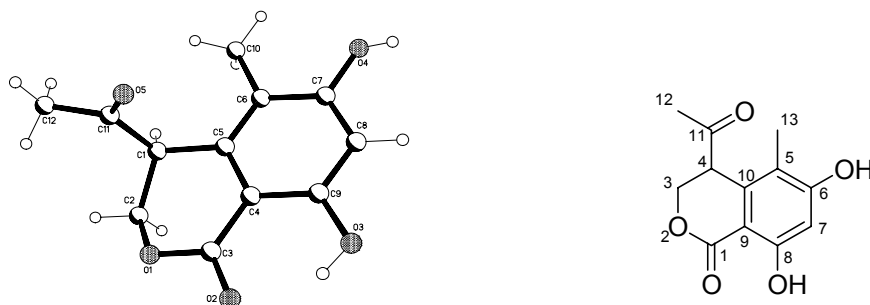
Der dünnschichtchromatographische Vergleich der Extrakte ergab aber keine signifikanten Unterschiede. Daher wurden die Extrakte vereinigt und anschließend säulenchromatographisch aufgetrennt. Hierzu diente bei der Auftrennung der ersten Kultur als Laufmittel

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dem bis zu 10 % Methanol zugefügt wurde; die weitere Auftrennung der so erhaltenen Fraktionen gelang mittels präparativer Schichtchromatographie. In der unpolarsten Fraktion befanden sich verschiedene Triglyceride, in der mittleren Fraktion befanden sich verschiedene Fettsäuren und in der polarsten schließlich die Naturstoffe **4567-1** und **4567-2**. Die nochmalige Vortrennung eines Rohextraktes dieses Pilzes, der unter den selben Bedingungen gewonnen wurde, gelang durch SC mit einem Laufmittel-Gradienten von 100 % Petrolether bis 100 % Ethylacetat. In der Fraktion mittlerer Polarität war der Naturstoff **4567-3**, in der polarsten Fraktion befand sich als Hauptprodukt der Naturstoff **4567-1** und als Nebenprodukte die Naturstoffe **4567-4**, **4567-5** und **4567-6**. Der Naturstoff **4567-2** konnte aus der 2. Charge nicht isoliert werden.

### 2.1.1.3. Strukturaufklärung

#### 2.1.1.3.1 Naturstoff 4567-1

Der aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1 : 1) in farblosen Prismen kristallisierende Sekundärmetabolit **4567-1** schmilzt bei 204 °C. Auf dem DC ( $R_f = 0.36$ , CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1) ist er im UV-Licht bei 254 nm detektierbar. Der Naturstoff **4567-1** ist gut löslich in Ethylacetat und DMSO, mäßig löslich ist er in MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und CHCl<sub>3</sub>. Im <sup>13</sup>C-Spektrum sind 12 Signale detektierbar. Aus diesem und dem DEPT 135-Spektrum zeigt sich, dass es sich hierbei um zwei Methingruppen, eine Methylengruppe, zwei Methylgruppen und um sieben quartäre Kohlenstoffe handelt. Das <sup>13</sup>C-Signal bei  $\delta = 205.7$  ppm ist charakteristisch für eine Ketofunktion und das bei  $\delta = 170.1$  ppm für einen Carbonsäureester. Diese beiden Gruppen werden durch Banden im IR-Spektrum bei 1697 und 1662 cm<sup>-1</sup> bestätigt. Eine scharfe Bande bei 3307 cm<sup>-1</sup> im IR-Spektrum ist charakteristisch für eine OH-Schwingung. Aus diesen Daten sowie die Auswertung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums und des Massenspektrums lässt sich die Summenformel C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub> aufstellen. Die Struktur von **4567-1** konnte durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden. Dabei stellte sich heraus, dass es sich um 4-Acetyl-3,4-dihydro-6,8-dihydroxy-5-methylisocoumarin handelt. In Abbildung 8 ist die Röntgenstruktur dargestellt.

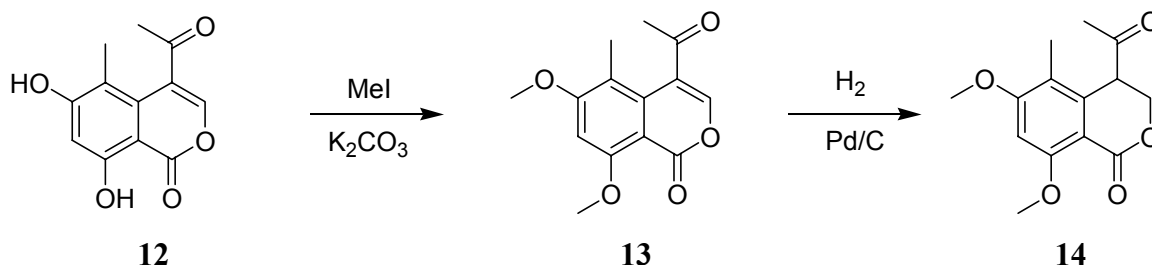


**Abb. 8:** links Röntgenstruktur, rechts Strukturformel des Naturstoffs **4567-1**

Es zeigte sich, dass das Isocoumarin **4567-1** optisch inaktiv ist. Das Stereozentrum am Kohlenstoffatom C-4 ist doppelt aktiviert. Es ist in  $\alpha$ -Position zur Carbonylgruppe und in benzyli-scher Position und daher leicht racemisierbar.

Die Literaturrecherche ergab, dass der Naturstoff **4567-1** erstmals 1966 als Dimethylether semisynthetisch hergestellt wurde<sup>[19]</sup>. 4-Acetyl-6,8-dihydroxy-5-methylisocoumarin (**12**) welches aus dem Pilz *Aspergillus viridinutans* isoliert wurde, wurde zuerst durch Methylierung in **13** und anschließend durch Hydrierung in das Dimethoxyisocoumarin **14** übergeführt. Reaktionsschema 1 zeigt die entsprechende Synthese.

**Reaktionsschema 1:** Darstellung von 4-Acetyl-6,8-dimethoxy-5-methylisocoumarin (**14**)



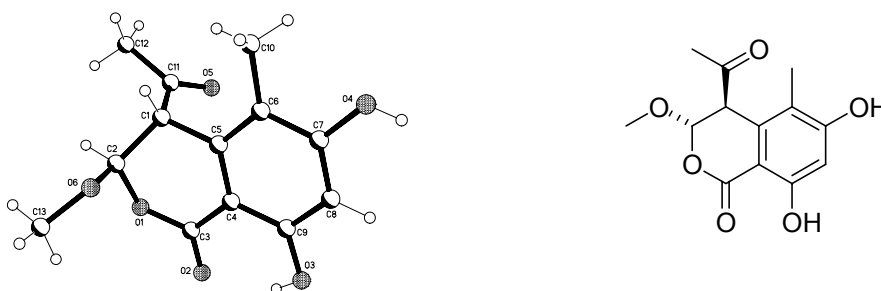
1983 wird der Naturstoff als Metabolit des Pilzes *Aspergillus viridinutans* in dem Buch „Fungal Metabolites II“ beschrieben<sup>[20]</sup>. Der 6-Methylether wurde 1996 von Gloer aus dem Pilz *Cercophora areolata* erstmals isoliert<sup>[21]</sup>.

### 2.1.1.3.2 Naturstoff 4567-2

Der aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (1 : 1) in farblosen Prismen kristallisierende Sekundärmetabolit **4567-2** schmilzt bei 207 °C. Auf dem DC (R<sub>f</sub> = 0.42, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1) ist diese Substanz im UV-Licht bei 254 nm gut detektierbar. Anhand des <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums und des DEPT 135-Experiments kann man entnehmen, dass dieser Naturstoff aus 3 Methylgruppen, zwei aliphatischen und einer aromatischen Methingruppe und aus sieben quartären Kohlenstoffen besteht.

Das Signal bei  $\delta = 203.5$  ppm spricht für eine Ketogruppe. Aus dem HMQC-Spektrum kann man erkennen, dass das Proton bei  $\delta = 5.65$  ppm mit dem Kohlenstoffatom bei  $\delta = 102.2$  ppm koppelt. Dieses ist ein deutlicher Hinweis auf ein Acetal. Die Bande bei  $3356\text{ cm}^{-1}$  im IR-Spektrum lässt auf die Anwesenheit einer Hydroxygruppe schließen. Aus der Masse des Molekülions von  $266.079\text{ m/z}$ , welche durch Bestimmung der Präzisionsmasse ermittelt wurde, lässt sich eine Summenformel von  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$  aufstellen. Insgesamt sind die NMR-Daten dem des Naturstoffs **4567-1** recht ähnlich. So, dass auch hier von einem Coumarin ausgegangen werden konnte. Die Kopplungskonstante der Protonen, die bei  $\delta = 5.65$  und  $4.24$  ppm absorbieren, von  $1.3\text{ Hz}$  zeigt, dass die Substituenten an C-3 und C-4 *trans*-bisequatorial zu einander stehen.

Die genaue Struktur des Naturstoffs **4567-2** wurde mittels Röntgenstrukturanalyse belegt. Es handelt sich hierbei um 4-Acetyl-3,4-dihydro-6,8-dihydroxy-3-methoxy-5-methylisocoumarin. Wie aus der Abbildung 9 zu entnehmen ist, wird hiermit auch die *trans*-Stereochemie belegt.



**Abb. 9:** links Naturstoff **4567-2** im Kristall, rechts Strukturformel

Bei der Messung des Drehwertes ergibt sich, wie bei dem Naturstoff **4567-1**, dass dieser optisch inaktiv ist und das Isocoumarin **4567-2** somit racemisch vorliegt. Eine Literaturrecherche in der Chemical Abstracts Datenbank zeigt, dass diese Substanz bisher nicht beschrieben worden ist.

### 2.1.1.3.3 Naturstoff **4567-3**

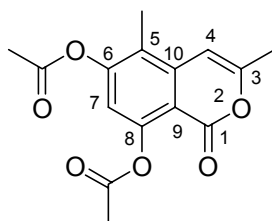
Der aus  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  amorph erstarrende farblose Sekundärmetabolit **4567-3** schmilzt bei  $142\text{ }^\circ\text{C}$ . Auf dem DC ( $R_f = 0.23$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ist er im UV-Licht bei  $254\text{ nm}$  detektierbar. Die scharfen Absorptionsbanden bei  $1774\text{ cm}^{-1}$  und  $1735\text{ cm}^{-1}$  im IR-Spektrum sind ein Indiz für die Anwesenheit von zwei verschiedenen Carbonylgruppen. Aus dem HREIMS ergibt sich die Masse des Molekülions mit  $290.078\text{ m/z}$ . Aus diesem Messwert kann die Summenformel des

Naturstoffs **4567-3** mit  $C_{15}H_{14}O_6$  bestimmt werden. Im Massenspektrum sind zwei Peaks, deren Massendifferenz 42  $m/z$  bzw. 84  $m/z$  zum Molekülion ist. Die Massendifferenz von 42 lässt sich auf die Abspaltung von Keten ( $C_2H_2O$   $m/z = 42$ ) zurückführen. Die Umlagerung und Abspaltung von Keten in der Gasphase ist charakteristisch für phenolische Acetatgruppen. Aus dem  $^1H$ -, dem  $^{13}C$ -Spektrum und dem DEPT 135-Experiment zeigt sich, dass die Substanz aus zwei Methin-, vier Methylgruppen und neun quartären Kohlenstoffen aufgebaut ist. Die Auswertung der Spektren ergibt, dass das Molekül einen penta-substituierten aromatischen Ring, sowie eine heterosubstituierte Doppelbindung enthalten muss. Im  $^1H$ -Spektrum sind nur Singulets vorhanden. Daher kann die Konnektivität der Kohlenstoffatome nur aus den Daten des HMBC-Spektrums ermittelt werden. Ein Signal im HMBC-Spektrum zeigt typischerweise eine  $^2J$ -,  $^3J$ - und seltener auch eine  $^4J_{C,H}$ -Kopplung. Aus Tabelle 3 können die Kopplungen entnommen werden.

**Tabelle 3:** NMR-Daten von **4567-3**

Atom-Bez.	$^1H$ -NMR $\delta$ (ppm), M	$^{13}C$ -NMR $\delta$ (ppm), M	HMBC-Kopplungen $^nJ_{H,C}$ ( $n > 1$ )
A	–	169.5, s	–
B	–	168.1, s	–
C	–	159.1, s	–
D	–	155.6, s	–
E	–	153.7, s	–
F	–	150.7, s	–
G	–	139.9, s	–
H	–	122.2, s	–
I	6.89, s	116.4, d	E, F, H, J
J	–	110.8, s	–
K	6.40, s	100.2, d	D, H, J
L	2.43, s	21.1, q	A
M	2.40, s	20.8, q	B
N	2.28, s	19.9, q	D, K
O	2.24, s	11.7, q	E, G, H

Aus den NMR-, IR- und MS-Daten lässt sich folgender Strukturvorschlag für den Naturstoff **4567-3** machen. In Abbildung 10 ist der Sekundärmetabolit **4567-3** mit der Nummerierung dargestellt.



**Abb. 10:** Struktur des Naturstoffs **4567-3**

Der chemische Name des literaturunbekannten Stoffes **4567-3** ist 6,8-Diacetoxy-3,5-dimethylisocoumarin. Das Isocoumarin **13** (in Reaktionsschema 1) hat das gleiche Substitutionsmuster wie das hier beschriebene.

#### 2.1.1.3.4 Naturstoff 4567-4

Der Sekundärmetabolit **4567-4** fällt als farbloser Feststoff mit einem  $R_f$ -Wert von 0.28 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH = 9 : 1) und einem Schmelzpunkt von 175-176 °C an. Er ist gut in Ethylacetat und Aceton löslich. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, welches in  $\text{CD}_3\text{OD}$  gemessen wurde, können neun Wasserstoffatome erkannt werden. Aus dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum und dem DEPT-Experiment ergibt sich, dass das Molekül aus zwei Methyl-, einer Methylen-, einer Methingruppe und sieben quartären Kohlenstoffen besteht. Das Signal bei  $\delta = 170.7$  ppm ist auf eine Estergruppe und das bei  $\delta = 100.0$  ppm auf eine Acetalgruppe zurückzuführen. Im IR-Spektrum können die Banden bei  $3307\text{ cm}^{-1}$  und  $3199\text{ cm}^{-1}$  OH-Schwingungen zugeordnet werden. Aus dem Massenspektrum ist das Molekülion bei  $224\text{ m/z}$  zu erkennen. Das hochaufgelöste Massenspektrum zeigt, dass dieser Peak eine Masse von  $224.0689\text{ m/z}$  hat. Hieraus lässt sich unter Berücksichtigung der IR- und NMR-Spektren eine Summenformel von  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$  aufstellen. Die genaue Struktur des Naturstoffs **4567-4** wird aus den NMR-Daten ermittelt. Sie wird durch die in Abbildung 11 dargestellte Röntgenstruktur bestätigt.

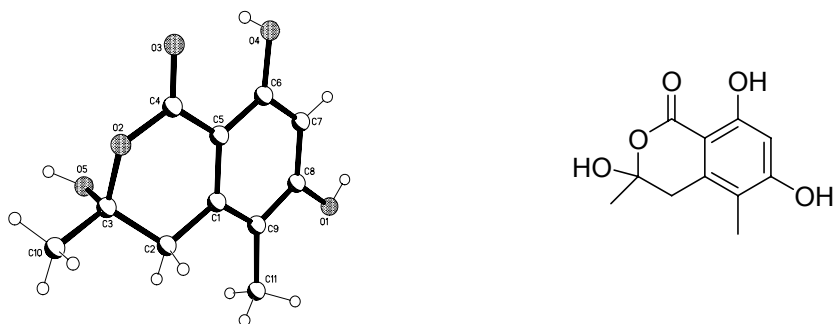


Abb. 11: links: Naturstoff **4567-4** im Kristall; rechts die Strukturformel

Es handelt sich hierbei um das bisher literaturunbekannte 3,4-Dihydro-3,6,8-trihydroxy-3,5-dimethylisocoumarin. Die Röntgendaten ergeben, dass das Hemiacetal **4567-4** als Racemat vorliegt. Was durch Öffnung des Ringes in Lösung und anschließendem Ringschluss erklärt werden kann.

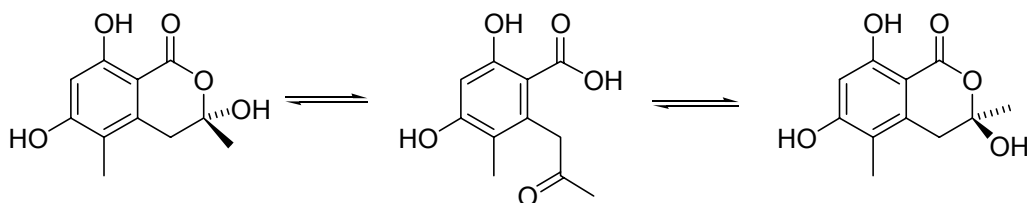


Abb. 12: Ringöffnung und Ringschluss des Hemiacetals **4567-4**

### 2.1.1.3.5 Naturstoff **4567-5**

Der als hellgelbe, hochviskose Flüssigkeit anfallende Sekundärmetabolit **4567-5** ist dünnschichtchromatographisch mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm detektierbar und hat einen  $R_f$ -Wert von 0.23 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH = 9 : 1). Die Substanz ist gut löslich in Methanol, Acetonitril und Aceton. Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind zwei Dubletts im aromatischen Bereich mit einer Kopplungskonstanten von 2.4 Hz zu erkennen. Dieses ist ein typischer Wert für eine *meta*-Kopplung. Weiterhin sind drei Doppel-Dubletts und zwei Singulets vorhanden. Aus dem  $^{13}\text{C-NMR}$  und dem DEPT 135-Experiment sind zwei Methyl-, eine Methylen-, drei Methingruppen sowie fünf quartäre Kohlenstoffatome detektierbar. Im IR-Spektrum zeigt die Bande bei  $3369\text{ cm}^{-1}$ , dass im Molekül eine Hydroxygruppe vorhanden ist. Aus den ein- und zweidimensionalen NMR-Daten und den IR-Banden lässt sich folgende Struktur erstellen:



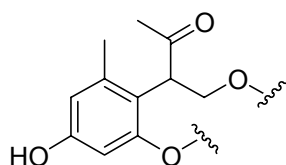


Abb. 13: Strukturvorschlag für den Naturstoffs **4567-5**

Im Massenspektrum wird das Molekülion bei 192  $m/z$  detektiert, welches eine Präzisionsmasse von 192.0791  $m/z$  besitzt. Somit lässt sich eine Summenformel von  $C_{11}H_{12}O_3$  aufstellen. Hieraus ergibt sich dann unter Einbeziehung der anderen Daten, dass es sich bei diesem Sekundärmetaboliten um das bisher unbekannte 3-Acetyl-6-hydroxy-4-methyl-2,3-dihydrobenzofuran handelt.

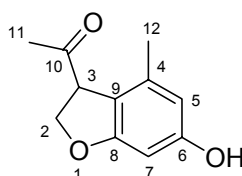
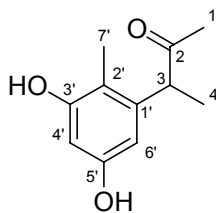


Abb. 14: Struktur des Naturstoffs **4567-5**

#### 2.1.1.4. Naturstoff **4567-6**

Der als farblose, hochviskose Flüssigkeit anfallende Sekundärmetabolit **4567-6** ist dünnschichtchromatographisch mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm detektierbar und hat einen  $R_f$ -Wert von 0.35 ( $CH_2Cl_2$  : MeOH = 98 : 2). **4567-6** ist in organischen Lösungsmitteln mittlerer Polarität wie  $CHCl_3$  gut löslich. Im  $^1H$ -NMR-Spektrum sind zwei Dubletts im aromatischen Bereich mit einer typischen *meta*-Kopplungskonstanten von 2.4 Hz zu erkennen. Zudem erkennt man ein breites Singulett bei  $\delta = 5.93$  ppm, typisch für phenolische OH-Gruppen, ein Quartett bei 3.89 ppm, zwei weitere Singulets bei 2.12 und 1.98 ppm sowie ein Dublett bei 1.22 ppm. Aus dem  $^{13}C$ -Spektrum und dem DEPT-Experiment ergibt sich, dass das Molekül aus drei Methyl-, drei Methingruppen und fünf quartären Kohlenstoffen besteht. Das Signal bei  $\delta = 212.5$  ppm ist typisch für eine Ketofunktion, die durch eine IR-Bande bei  $1699\text{ cm}^{-1}$  bestätigt wird. Aus dem hochauflösenden Massenspektrum lässt sich die Summenformel des Sekundärmetaboliten **4567-6** mit  $C_{11}H_{14}O_3$  bestimmen. Aus dem COLOC-Spektrum und den anderen spektroskopischen Daten zeigt sich, dass es sich bei **4567-6** um 3-(3',5'-Dihydroxy-2'-methylphenyl)-2-butanon handelt.



**Abb. 15:** Naturstoff **4567-6**

Die Literaturrecherche ergibt, dass dieses Butanonderivat **4567-6** bisher nicht als Naturstoff bekannt gewesen ist. Es wurde aber bereits als Syntheseprodukt 1981 beschrieben<sup>[22]</sup>.

### 2.1.1.5. Biologische Aktivität der Sekundärmetabolite

Die biologische Aktivität der isolierten Verbindungen wird im Agardiffusionstest festgestellt. Beim Agardiffusionstest, der auch als Plättchentest bezeichnet wird, wird eine Lösung der Substanz in Aceton, Methanol oder einem Gemisch dieser Lösungsmittel angesetzt, deren Konzentration zwischen 1 und 10 mg/mL beträgt. Zur Untersuchung auf fungizide, bakteriozide und algizide Aktivität werden Filterplättchen mit der Lösung getränkt und auf Hartagarplatten gelegt, die dann mit den Testorganismen besprüht werden. Diese sind in Tabelle 4 mit den verwendeten Abkürzungen aufgeführt.

**Tabelle 4:** Testorganismen

Abkürzung	Organismus	Art
Ec	<i>Escherichia coli</i>	Gram-negatives Bakterium
Bm	<i>Bacilluls megaterium</i>	Gram-positives Bakterium
Ust	<i>Ustilago violacea</i>	Ustomycet
Eur	<i>Eurotium repens</i>	Ascomycet
Mm	<i>Mycothypha microspora</i>	Zygomycet
Fu	<i>Fusarium oxysporum</i>	Deuteromycet
Chl	<i>Chlorella fusca</i>	Chlorophyt

Bei den Bakterien und Pilzen werden nach zwei bis drei Tagen, bei *Chlorella fusca* nach vier bis sieben Tagen die entsprechenden Hemmhöfe ausgewertet. Dabei ist neben der Größe der Hemmhöfe auch die Vollständigkeit der Hemmung in den Höfen von Bedeutung.

Da das Rohextrakt gute Wirkung gegen verschiedene Pilze zeigte sind die isolierten Verbindungen auf fungizide Eigenschaften untersucht worden.

**Tabelle 5:** Plättchentest der Naturstoffe des Pilzstammes 4567

Naturstoff	Konzentration [mg/mL]	Mm	Eur	Ust
<b>4567-1</b>	10	0	0	0
<b>4567-2</b>	10	—	0	0
<b>4567-3</b>	9	3	2	2
<b>4567-4</b>	10	0	0	0
<b>4567-5</b>	8	0	2	0
<b>4567-6</b>	10	0	0	0

Zahlen geben den Hemmhofradius in mm an.

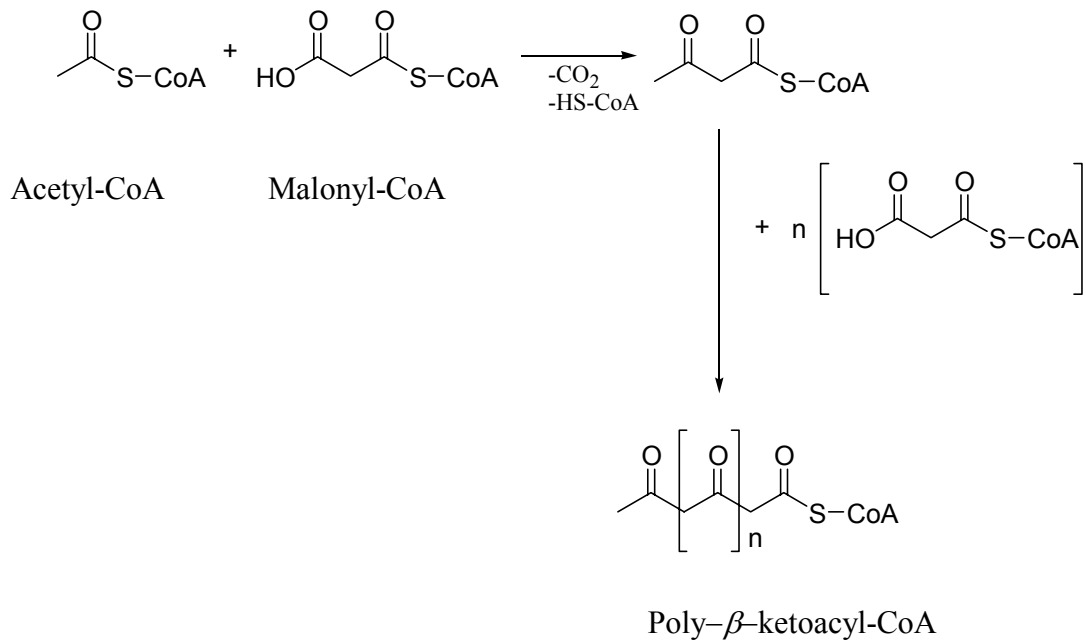
Aus den Testungen geht hervor, dass das Isocoumarin **4567-3** fungizide Wirkung besitzt. Ebenfalls zeigt das Benzofuran **4567-5** eine mäßige Aktivität gegen *Eurotium repens*.

#### 2.1.1.6. Biosynthese

Bei den Naturstoffen **4567-1** – **4567-4** handelt es sich um Isocoumarine. Diese, sowie das Furanderivat **4567-5** und das Butanonderivat **4567-6** sind Polyketide. Sie haben alle eine Methylgruppe am aromatischen Ring, der nicht aus der üblichen Polyketid-Biosynthese stammt.

Unter den Polyketiden werden Naturstoffe verstanden, die über Polyketosäuren als Intermediate gebildet werden. Die Fettsäuren sind wohl die meist gebildeten Polyketide.

Der Begriff Polyketid wurde 1907 von Collie eingeführt<sup>[23]</sup>. Die Polyketosäuren werden durch Kondensation eines Start-Moleküls mit Malonyl-CoA und anschließender Decarboxylierung gebildet. Katalysiert wird diese Reaktion durch verschiedene Polyketid-Synthasen. In Abbildung 16 ist die Bildung von Poly- $\beta$ -ketacyl-CoA schematisch dargestellt. Diese Reaktion ist eine kontrollierte Oligomerisierung.

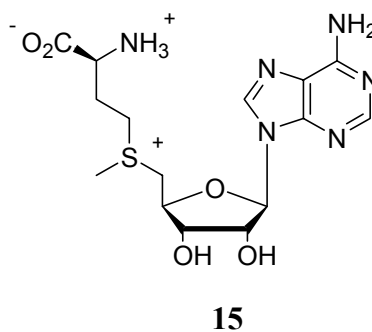


**Abb. 16:** Bildung von Poly- $\beta$ -ketoacyl-CoA

Als Start-Molekül dient meist Acetyl-CoA, aber auch andere wie Propionyl-CoA werden genutzt. Die Verschiedenartigkeit der Polyketid-Naturstoffe beruht auf den weiteren Umsetzungen der Ketogruppe während der Biosynthese. Die beiden Extremfälle sind die komplette Reduktion der Carbonylgruppen zu Methylengruppen und die Beibehaltung aller Ketogruppen<sup>[24]</sup>. Im Zuge der Fettsäuresynthese werden die Ketogruppen komplett reduziert und so die Poly- $\beta$ -ketosäuren in Fettsäuren übergeführt.

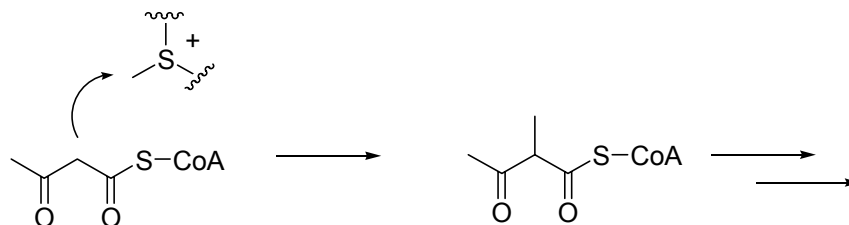
Eine Reihe von Polyketiden, wie auch die Naturstoffe **4567-1** – **4567-6** besitzen Methylgruppen, die nicht aus der Polyacetatkette stammen.

Es gibt zwei Varianten, mit der diese Methylgruppen biosynthetisch eingeführt werden. Eine Möglichkeit ist, dass als Startmolekül nicht Acetyl-CoA sondern Propionyl-CoA von der Natur genutzt wird. Die andere ist die nachträgliche Einführung durch L-Methionin, welches als S-Adenosyl-L-methionin (**15**) (SAM) aktiviert ist.



**Abb. 17:** S-Adenosyl-L-methionin (**15**) (SAM)

Birch erkannte 1958 als erster die Rolle des Methionins als Methylgruppen-Donor<sup>[25]</sup>. Die Methylierung findet nicht an einer gesättigten Kette statt; stattdessen geht der Angriff von einer Doppelbindung oder von einer aktivierten Methylengruppe auf die Methylgruppe des SAMs aus, wie in Abbildung 18 dargestellt.



**Abb. 18:** Methylierung einer aktivierten Methylengruppe durch SAM (15)

## 2.1.2. Stamm 3304

### 2.1.2.1. Pilzbeschreibung

Der Pilzstamm 3304 stammt aus einer Bodenprobe von der Richards Bay in Südafrika. Taxonomisch konnte dieser noch nicht bestimmt werden.

### 2.1.2.2. Isolierung des Naturstoffs 3304-1

Der Pilzstamm 3304 wurde 89 Tage lang bei Raumtemperatur auf den Nährmedien Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar kultiviert. Anschließend wurden die Pilzkulturen homogenisiert und einmal mit Petrolether und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Lösungsmittel wurden abgedampft und der Rückstand von 250 mL Kulturmedium für Bioaktivitätsmessungen in 5 mL einer Aceton-Methanol-Lösung (1 : 1) aufgenommen.

**Tabelle 6:** Agardiffusionstest des Rohextraktes 3304

Medium	Fraktion	Ec	Bm	Ust	Eur	Mm	Fu	Chl
Bio/M/S	PE	0	0	2.0	2.5	1.2	0.5	0.6
	E	0.3	0.4	2.5	3.0	2.0	1.5	0.7

Die Zahlen geben die Größe der Hemmhöfe in cm an

Der Extrakt zeigt gute fungizide Wirkung, eine mäßig bakterizide und algizide Wirkung.

Herr John trennte die Rohextrakte mittels Säulenchromatographie in zwölf Fraktionen. Die Fraktionen 3 und 4 wurden dann von mir weiter bearbeitet. Der dünnschichtchromatographische Vergleich zeigte, dass die beiden Fraktionen sich ähnelten und wurden daher ver-

einigt. Aus dieser Fraktion konnte durch Säulenchromatographie an Kieselgel der Naturstoff **3304-1** isoliert werden.

### 2.1.2.3. Strukturaufklärung

Der Naturstoff **3304-1** wird in Form eines gelben Öls mit einem  $R_f$ -Wert von 0.4 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH = 99 : 1) isoliert. Auf dem DC ist er im UV-Licht der Wellenlänge 254 nm detektierbar. Er löst sich gut in Lösungsmitteln mittlerer Polarität und besitzt einen spezifischen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = +20^\circ$  ( $c = 0.5$ , EtOH). Die scharfe Absorptionsbande bei  $1734\text{ cm}^{-1}$  ist ein Indiz für eine Carbonylgruppe. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sind 26 Signale zu erkennen, die mit Hilfe des DEPT 135-Experiments als fünf Methyl-, zwei Methylen-, zwei Methoxy-, neun Methingruppen und acht quartäre Kohlenstoffatome identifiziert werden können. Aufgrund der chemischen Verschiebung im Spektrum müssen zwei Methylen-, eine Methingruppe und ein quartäres Kohlenstoffatom monooxygeniert sein. Auffällig tieffeldverschoben ist das CH-Signal bei  $\delta = 159.2$  ppm. Solch ein Signal ist typisch für ein Kohlenstoffatom, welches sich in  $\beta$ -Position eines  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Esters befindet, ist und zusätzlich mit einer elektro-negativen Gruppe substituiert ist. Für diese Gruppe spricht auch das Signal bei  $\delta = 168.4$  ppm, welches im Verschiebungsbereich für ungesättigte Ester liegt, die scharfe Carbonylbande im IR-Spektrum und das Singulett bei  $\delta = 7.51$  ppm im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum befinden sich fünf Singuletts zwischen 1.23 und 1.95 ppm, deren Integration für je eine Methylgruppe spricht. Die Signale bei  $\delta = 1.23$  und 1.48 ppm sind typisch für Methylgruppen an einem aliphatischem Kohlenstoffatom, die bei  $\delta = 1.70$ , 1.81 und 1.95 für solche an einem olefinischen C-Atom. Zwischen  $\delta = 6.86$  und 6.99 ppm sind die Signale von drei Protonen. Eines von diesen zeigt eine typische *meta*-Kopplung von 2.0 Hz, ein anderes eine typische *ortho*-Kopplung und das dritte, ein doppeltes Dublett, eine *ortho*- und *meta*-Kopplung, so dass von einem 1,2,4-trisubstituierten Aromaten ausgegangen werden kann. Alle Signale sind typisch für Strobilurine, die schon früher von Herrn John aus diesem Pilz isoliert werden konnten<sup>[26]</sup>. Ein dünnschichtchromatographischer Vergleich ergab Identität mit dem Stobilurin D.

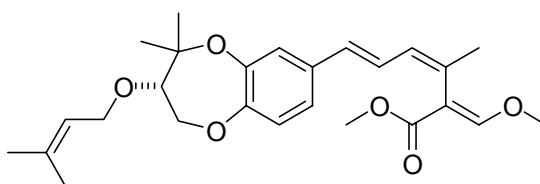


Abb. 19: Strobilurin D (**3304-1**)

Die Literaturrecherche ergibt, dass das Strobilurin D erstmals 1990 aus dem Ascomyceten *Bolinea lutea* Sacc. isoliert und charakterisiert wurde<sup>[27,28]</sup>. Die Stereochemie wurde erst 1999 aufgeklärt. Mit der Aufklärung der absoluten Konfiguration ging eine Umbenennung einher<sup>[29]</sup>. Seitdem ist der Name Strobilurin D üblich, früher hieß der Sekundärmetabolit **3304-1** Strobilurin G.

Die Strobilurine bilden zusammen mit den Oudemansinen die Gruppe der antifungischen  $\beta$ -Methoxyacrylat-Antibiotika. Strobilurin A (**5**) und dem Oudemansin A (**7**) stellten Leitstrukturen dar, von denen die Entwicklung verschiedener Fungizide ausging.

### 2.1.3. Stamm 4689

#### 2.1.3.1. Pilzbeschreibung

Bei dem Pilzstamm 4689 handelt es sich um eine *Fusarium* Spezies, die zu den Fungi imperfecti gezählt werden. Er wurde als Endophyt aus den Wurzeln der *Atropa belladonna* aus einem Wald namens Asse in der Nähe von Wolfenbüttel isoliert.

#### 2.1.3.2. Isolierung des Naturstoffs 4689-1

Der Pilzstamm 5451 wurde 37 - 46 Tage lang bei Raumtemperatur auf den Nährmedien Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar kultiviert. Anschließend wurden die Pilzkulturen homogenisiert und einmal mit Petrolether und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Der Rückstand von 250 mL Kulturmedium wurde in 5 mL eines Aceton/Methanol-Gemisches (1 : 1) aufgenommen und für die Bioaktivitätsmessungen genutzt. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse des Agardiffusionstests aufgelistet.

**Tabelle 7:** Agardiffusionstest des Rohextraktes

Medium	Fraktion	Ec	Bm	Ust	Eur	Mm	Fu	Chl
Bio	PE	0	0.4 – 0.5	0.2	2	0	0	0
	E	0	0.3 – 0.5	0.3	3	0	0.2	0.3
M/S	PE	0	0.5 – 0.6	0.5	0	0	0	0.5
	E	0	0	0.8	1.5	0	0.4	0.4

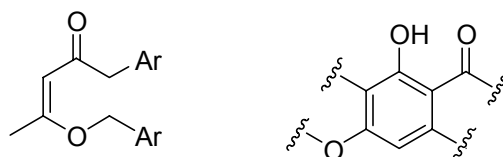
Die Zahlenwerte geben den Durchmesser der jeweiligen Hemmhöfe in cm an.

Das Extrakt zeigt keine Wirkung gegen *Escherichia coli* (Ec) und nur eine mäßig bakterizide Wirkung gegen *Bacillus megaterium* (Bm). Der Petroletherextrakt des Biomalz-Kultivats sowie die Ethylacetatextrakte des Biomalz- und Malz-Soja-Kultivats zeigen gute Wirkung gegen *Eurotium repens* (Eur). Desweiteren zeigen die Rohextrakte eine schwache algizide Wir-

kung gegen *Chlorella fusca* (Chl), eine schwache Wirkung gegen *Ustilago violacea* (Ust), sowie *Fusarium oxysporum* (Fu). Gegenüber *Mycothypha microspora* (Mm) sind sie inaktiv. Die vier Extrakte wurden nach DC-Vergleichen vereinigt und mittels Säulenchromatographie in drei Fraktionen getrennt. Aus der Fraktion mittlerer Polarität konnte der Naturstoff **4689-1** durch Kristallisation gewonnen werden.

### 2.1.3.3. Strukturaufklärung

Der Naturstoff **4689-1** wurde in Form von hellgelben Kristallen, die einen Schmelzpunkt von 293 °C haben, isoliert. Auf dem DC ist er durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm detektierbar, während er nur schwach mittels des Ethanol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Reagenz erkennbar ist. Die Kristalle sind in gängigen Lösungsmitteln nur mäßig löslich, einzig in heißem DMSO sind sie gut löslich. Im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sind zwei Dubletts bei  $\delta = 2.48$  und 6.28 ppm und vier Singulets zu sehen. Die beiden Singulets bei  $\delta = 10.42$  und 14.70 ppm sind ein Hinweis auf chelierte OH-Gruppen. Die scharfe Absorptionsbande bei 1749 cm<sup>-1</sup> im IR-Spektrum ist ein Indiz für eine Carbonylgruppe. Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum wurde in DMSO-d<sub>6</sub> bei 60 °C aufgenommen, da die Löslichkeit in Chloroform oder Dichlormethan zu gering ist und in diesen Lösemitteln trotz langer Messzeiten nicht alle Kohlenstoffatome detektiert werden konnten. Anhand des <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums und des DEPT 135-Experiments zeigte sich, dass **4689-1** aus zwei Methyl-, zwei Methingruppen und elf quartären Kohlenstoffatomen besteht. Das quartäre Kohlenstoffatom, welches ein Absorptionssignal bei  $\delta = 187.2$  besitzt, ist typisch für ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Keton. Aus den eindimensionalen NMR-Spektren und dem HMBC-Spektrum lassen sich als Fragmente des Naturstoffs **4689-1** ein pentasubstituierter Benzolring, der zwei Sauerstoffsubstituenten trägt und ein Pyranonring konstruieren. Eine genauere Bestimmung der Konnektivität ist nicht möglich.

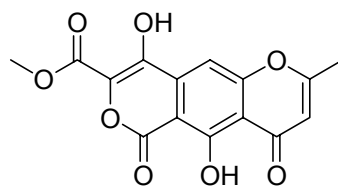


**Abb. 20:** Zwei Fragmente des Naturstoffs **4689-1**

Es ließ sich eine Präzisionsmasse von 318.0376 *m/z* bestimmen, die einer Summenformel von C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub> entspricht. Ein Vergleich mit der Datenbank zeigte, dass das Massenspektrum mit seinen Fragmenten und Signalintensitäten nahezu identisch mit dem des 5,9-Dimethoxy-2-methyl-4*H*,6*H*-pyrano[3,4-*g*]-1-benzopyran-4,6-dion-8-carbonsäuremethylesters ist. Ein Vergleich der anderen Daten mit den publizierten<sup>[30]</sup> ergab, dass das <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>13</sup>C-NMR, das



UV- sowie das IR-Spektrum ähnlich sind. Einzig der gemessene Schmelzpunkt weicht deutlich vom Literaturwert ab.



**Abb. 21:** Struktur des Lateropyrons (**4689-1**)

**4689-1** wurde erstmals 1984 als Sekundärmetabolit des Pilzes *Fusarium lateritium* Nees beschrieben<sup>[30]</sup>. Die Strukturaufklärung gelang den Autoren indem sie die Hydroxygruppen des Naturstoff mit Diazomethan veretherten, aus dem Dimethylether Einkristalle herstellten und so die Struktur durch Röntgenstrukturanalyse aufklärten. Nach dem Namen der Pilzart und dem Strukturelement des Pyronringes bekam er den Trivialnamen Lateropyron. 1986 wurde die Struktur revidiert, den Autoren gelang es vom Naturstoff Einkristalle zu züchten und konnten so zweifelsfrei die Struktur zu belegen<sup>[31]</sup>.

#### 2.1.3.4. Biologische Aktivität des Sekundärmetaboliten

Das Rohextrakt des Pilzstammes 4689 zeigte gute fungizide Wirkung gegen *Eurotium repens* (Eur) und eine mäßige gegen *Ustilago violacea* (Ust), Des weiteren zeigte es eine schwache algizide Wirkung gegen *Chlorella fusca* (Chl). Diese drei Organismen wurden zur Testung der biologischen Aktivität von Lateropyron (**4689-1**) gewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 aufgelistet.

**Tabelle 8:** Agardiffusionstest des Lateropyrons (**4689-1**)

Naturstoff	Konzentration [mg/mL]	Chl	Eur	Ust
<b>4689-1</b>	10	0.1	0.1	0.1 WH

Zahlen geben die Größe des Hemmhofs in cm an. WH: Wachstumshemmung

Die Wirkung des Naturstoffs gegenüber den Testorganismen ist nur mäßig. Aus der Literatur ist aber bekannt, dass Pyron **4689-1** wachstumshemmend auf *Staphylococcus aureus* wirkt. *Staphylococcus* ist eine Gattung von grampositiven, traubenähnlich zusammengelagerter Kugelbakterien. Von den zahlreichen Arten dieser Gattung hat *Staphylococcus aureus* die größte medizinische Bedeutung. Diese Bakterien sind Erreger von abszedierenden Entzündungen sowie von Herzentzündungen und Sepsis. Durch die Fähigkeit zur relativ

raschen Bildung von Antibiotikaresistenzen gehören sie zu den bedeutenden Erregern von Krankenhausinfektionen<sup>[1]</sup>.

## 2.1.4. Stamm 5451

### 2.1.4.1. Pilzbeschreibung

Bei dem Pilzstamm 5451 handelt es sich um den Pilz *Aphanocladium spectabile*. Dieser wird zu den *Fungi imperfecti* und der Klasse der Hyphomycetes gezählt. Er wurde aus einem Waldboden bei Berlin isoliert.

### 2.1.4.2. Isolierung der Naturstoffe 5451

Der Pilzstamm 5451 wurde 110 Tage bei Raumtemperatur auf den Nährmedien Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar kultiviert. Er wurde auf insgesamt 7500 mL Kulturmedium angezogen. Anschließend wurden die Pilzkulturen homogenisiert und einmal mit Petrolether und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Lösungsmittel wurden abgedampft und der Rückstand von 250 mL Kulturmedium für die Bioaktivitätsmessungen in 5 mL einer Aceton-Methanol-Lösung (1 : 1) aufgenommen.

Die Rohextrakte dieses Pilzstammes zeigten in den verschiedenen Agardiffusionstest folgende Aktivitäten (Tabelle 9):

**Tabelle 9:** Agardiffusionstest des Rohextraktes

Medium	Fraktion	Ec	Bm	Ust	Eur	Mm	Fu	Chl
Bio	PE	0	0	3.0	1.8	1.5	0.5	0.5
	E	0.6	0.6	2.5	1.5	0.8	0.5	0.5
M/S	PE	0	0	2.5	1.8	0.6	0	0.8
	E	0	0.5	1.8	1.5	0.5	0.3	0.4

Die Zahlenwerte geben den Durchmesser der jeweiligen Hemmhöfe in cm an.

Das Extrakt zeigt eine schwache bakterizide Wirkung gegen *Escherichia coli* (Ec) und *Bacillus megaterium* (Bm). Eine gute fungizide Wirkung gegen *Ustilago violacea* (Ust), *Eurotium repens* (Eur), *Mycothypha microspora* (Mm) und *Fusarium oxysporum* (Fu), sowie eine mäßig algizide Wirkung gegen *Chlorella fusca* (Chl).

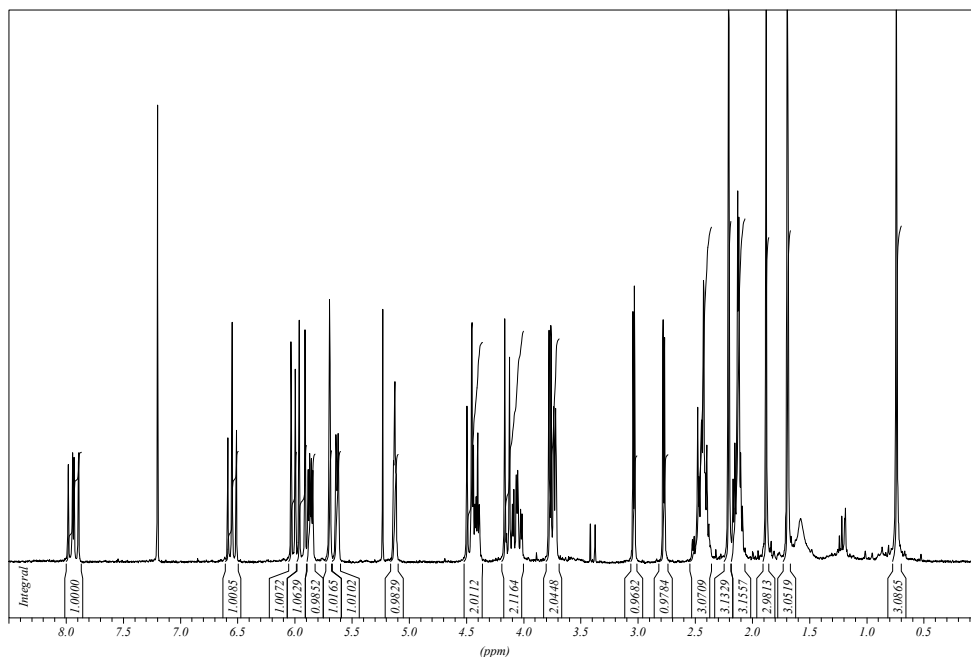
Die dünnschichtchromatographische Untersuchung der Ethylesterextrakte der Nährmedien Biomalz- und Malz-Soja-Agar zeigte, dass diese ähnlich waren und deshalb vereinigt werden konnten. Das Rohgemisch wurde säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem Elutionsgradienten von 100 % Petrolether (50 – 70 °C) bis reinem Dichlormethan und dann

mit Dichlormethan/Methanol-Lösungen bis zu 10 % Methanol gereinigt. Es wurden 6 Fraktionen gesammelt. Die beiden unpolaren Fraktionen enthielten hauptsächlich Fette und wurden nicht weiter bearbeitet. Aus der dritten Fraktion konnten 150 mg des Naturstoffs **5451-1** mittels präparativer Schichtchromatographie isoliert werden. Als Elutionsmittel diente hier Dichlormethan. Die Vierte enthielt 300 mg des Naturstoffs **5451-2**, der nach erneuter säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel mit einem Gemisch von Petrolether/Ethylacetat in reiner Form erhalten wurde. Die Naturstoffe **5451-3** und **5451-4** konnten nur durch Reversed-Phase-Chromatographie an RP-18 mit einem Wasser/Aceton Gemisch gereinigt werden.

### 2.1.4.3. Strukturaufklärung

#### 2.1.4.3.1 Naturstoff 5451-1

Der Naturstoff **5451-1** wurde in Form weißer, amorpher Kristalle mit einem Schmelzbereich von 131 bis 132 °C isoliert. Auf dem DC ist er im UV-Licht der Wellenlänge 254 nm gut detektierbar und hat einen  $R_f$ -Wert von 0.67 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH = 98 : 2). Er ist gut löslich in Lösemitteln mittlerer Polarität, wie Dichlormethan oder Chloroform. Der spezifische Drehwert beträgt  $[\alpha]_D^{20} = +32^\circ$  ( $c = 0.5$ , MeOH). Das IR-Spektrum zeigt bei  $1724\text{ cm}^{-1}$  eine intensive Absorptionsbande, die für Carbonylgruppen charakteristisch ist. Die NMR-Spektren der Verbindung zeigen, dass die Substanz vier Methygruppen besitzt, sie zeigen im Protonenspektrum jeweils ein Singulett bei  $\delta = 2.28, 1.94, 1.76$  und  $0.81$  ppm. Desweiteren sind noch sechs Methylengruppen, sechs olefinische und vier Heteroatom-substituierte, aliphatische Methingruppen und neun quartäre Kohlenstoffatome registrierbar. Die drei Signale zwischen  $\delta = 165$  und  $166$  ppm sind typisch für  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Ester, das bei  $\delta = 170.9$  für einen Ester. Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum, welches in Abbildung 22 dargestellt ist, lassen sich 34 Protonen erkennen.



**Abb. 22:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Naturstoffs **5451-1**

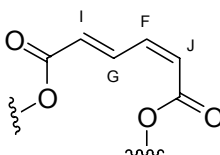
Die Zuordnung der Protonensignale zu den einzelnen  $^{13}\text{C}$ -Signalen wurde anhand des HMQC-Spektrums vorgenommen. In Tabelle 10 sind die Zuordnung sowie die Kreuzsignale aus dem H,H-Cosy-Spektrum aufgelistet.

**Tabelle 10:** NMR-Daten des Naturstoffs **5451-1**

Atom-Bez	$^{13}\text{C}$ -NMR $\delta(\text{ppm}), \text{M}$	$^1\text{H}$ -NMR $\delta(\text{ppm}), \text{M}$	H,H- COSY
A	170.9, s	—	—
B	165.8, s	—	—
C	165.6, s	—	—
D	165.5, s	—	—
E	157.0, s	—	—
F	139.9, d	6.62, pt	G, J
G	138.8, d	8.01, ddd	F, I, J
H	136.5, s	—	—
I	127.8, d	6.01, d	G
J	125.1, d	6.09, d	F
K	123.8, d	5.70, d	P
L	117.7, d	5.77, s	—
M	78.9, d	3.84, d	X

N	74.8, d	5.94, dd	X
O	68.8, d	5.20, pt	Y
P	67.0, d	3.80, d	K
Q	65.3, s	—	—
R	64.4, t	4.22, d; 4.54, d	—
S	60.4, t	4.15, ddd; 4.48, dt	W
T	49.0, s	—	—
U	47.9, t	2.85, d; 3.11, d	—
V	42.2, s	—	—
W	40.2, t	2.44 – 2.60, m	S
X	34.8, t	2.16 – 2.24 m; 2.44 – 2.60, m	M, N
Y	26.4 t	2.16 – 2.24, m	O
Z	21.0 q	1.94, s	—
Aa	20.5 q	1.76, s	—
Ab	17.1 q	2.28, s	—
Ac	7.0 q	0.81, s	—

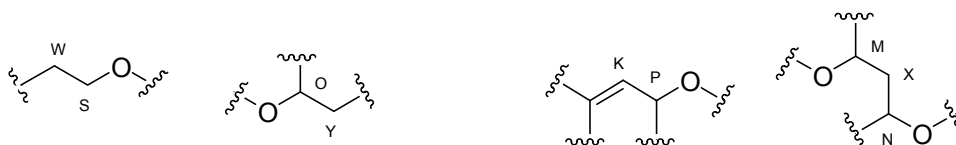
Das Fragment 1 lässt sich aus den H,H-Cosy und den Kopplungskonstanten, die aus dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ermittelt wurden, bestimmen. Das olefinische Proton G muss sich aufgrund seiner Tieffeldverschiebung von  $\delta = 8.01$  ppm in  $\beta$ -Position zu einer Estergruppe befinden. Es zeigt zu dem Proton I eine typische *trans*-Kopplung von 15.6 Hz, eine  $^3J$ -Kopplung von 11.5 Hz zu F sowie eine  $^4J$ -Kopplung von 0.8 Hz zu J. Die Konfiguration zwischen G und F lässt sich anhand der Konstanten nicht zweifelsfrei als *trans* oder *cis* zuordnen. Die Kopplung der Protonen F und J entspricht der einer typischen *cis*-Konfiguration, daher muss die Konfiguration zwischen G und F *trans* sein. Aufgrund der Tieffeldverschiebung des Kohlenstoffatoms F von  $\delta = 139.9$  ppm muss es sich ebenfalls in  $\beta$ -Position zu einer Estergruppe befinden. In Abbildung 23 ist das Fragment 1 dargestellt.



**Fragment 1**

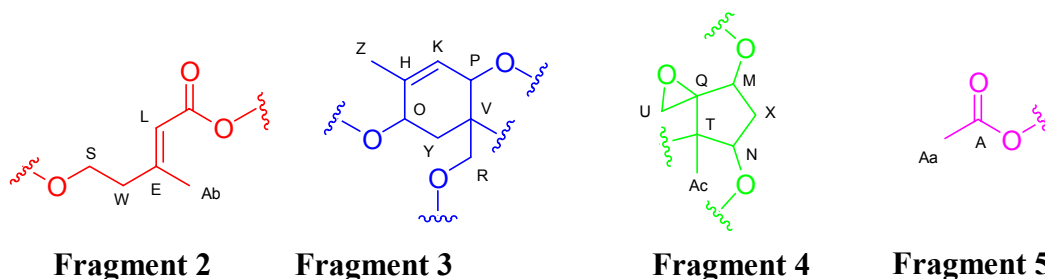
**Abb. 23:** Fragment 1 des Sekundärmetaboliten **5451-1**

Es lassen sich vier weitere Teilstrukturen aus den H,H-Cosy- und HMQC-Spektrum zweifelsfrei konstruieren. Sie sind in Abbildung 24 dargestellt.

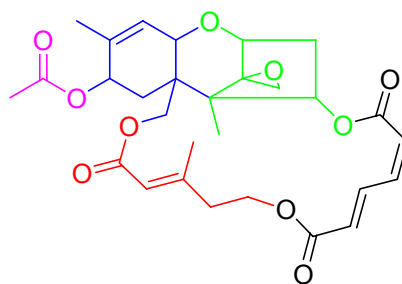


**Abb. 24:** vier Teilstrukturen des Naturstoffs **5451-1**

Mit Hilfe des HMBC-Spektrums lassen sich die vier Teilstrukturen zu den Fragmenten 2 bis 4 erweitern und das Fragment 5 aufstellen.



Massenspektroskopische Untersuchungen des Naturstoffs **5451-1** zeigen, dass er sich nur durch schonende, chemische Ionisierung mittels Ammoniak unzersetzt in die Gasphase überführen lässt. Die Masse des Molekülions ist  $542\ m/z$ . Daraus folgend lässt sich unter Berücksichtigung des  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums die Summenformel zu  $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{10}$  bestimmen. Hieraus ergibt sich, dass die freien Verbindungsstellen in den Fragmenten 1-4 miteinander verbunden werden müssen. Mit Hilfe des HMBC-Spektrums lassen sie die Fragmente, wie in Abbildung 25 dargestellt, zusammenfügen.



**Abb. 25:** Konnektivität des Naturstoffs **5451-1**

Die Suche in den Chemical Abstracts ergab, dass es sich hierbei um Verrucain L-Acetat handelt. Dieser Naturstoff wurde 1981 erstmals als Sekundärmetabolit von *Myrothecium verrucaria* beschrieben<sup>[32]</sup>. Da der Drehwert und der Schmelzpunkt nahezu identisch mit dem von Jarvis et. al. beschriebenen ist, kann die gleiche Stereochemie angenommen werden. In Abbildung 26 ist der Naturstoff **5451-1** mit Stereodiskreptoren gezeigt.

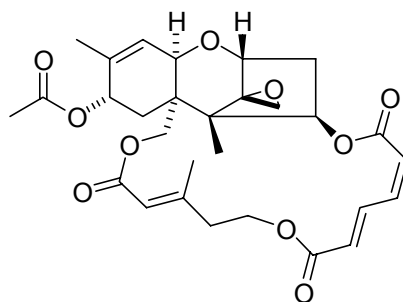


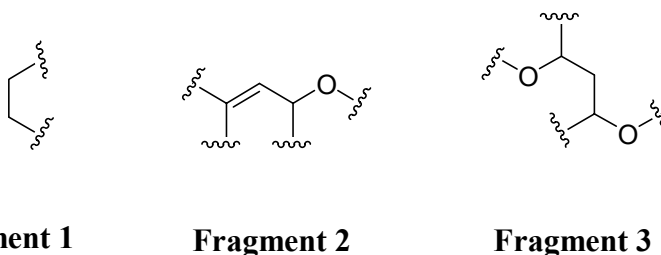
Abb. 26: Verrucain L-Acetat.

### 2.1.4.3.2 Naturstoff 5451-2

Der Naturstoff **5451-2** wurde als weißer, amorph kristallisierender Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 110 °C erhalten. Er löst sich gut in Lösungsmitteln mittlerer Polarität, wie Dichlormethan und Ethylacetat. Der Sekundärmetabolit hat einen  $R_f$ -Wert von 0.38 ( $\text{CHCl}_3$  :  $\text{MeOH} = 97 : 3$ ) und ist gut mit dem  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Ethanol}$ -Reagenz und im UV-Licht der Wellenlänge 354 nm detektierbar und hat einen spezifischen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = -30^\circ$  ( $c = 0.1$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). Das IR-Spektrum zeigt eine scharfe Absorptionsbande bei  $3436\text{ cm}^{-1}$ , was ein Hinweis auf eine Hydroxygruppe ist.

Im  $^{13}\text{C}$ -Spektrum sind 15 Signale zu erkennen, die mit Hilfe des DEPT 135-Experiments drei Methyl-, vier Methylen-, vier Methingruppen und drei quartären Kohlenstoffatomen zugeordnet werden können. Anhand der chemischen Verschiebung lässt sich zeigen, dass eine Methingruppe und ein quartäres Kohlenstoffatom olefinisch sind und dass eine Methylen-Gruppe, drei Methingruppen und ein quartäres Kohlenstoffatom monooxygeniert sein müssen.

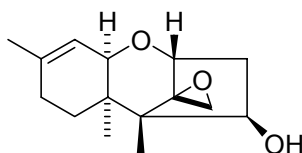
Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ist nur ein Dublett im olefinischen Bereich bei  $\delta = 5.38\text{ ppm}$ ; alle anderen Signale sind weiter hochfeldverschoben. Auffallend sind zwei AB-Signale bei  $\delta = 2.80$  und  $3.09\text{ ppm}$  mit einer Kopplungskonstante von 3.9 Hz, die auch bei dem Naturstoff **5451-1** erkennbar sind. Sie sind typisch für ein Epoxid. Weiterhin sind drei Singulets bei  $\delta = 0.79$ ,  $0.85$  und  $1.70\text{ ppm}$  detektierbar, die jeweils einer Methylgruppe entsprechen. Anhand ihrer Verschiebung müssen zwei von ihnen Substituenten quartärer aliphatischer Kohlenstoffatome und eines Substituent eines quartären olefinischen Kohlenstoffatoms sein. Anhand des  $\text{H,H-Cosy}$  und des  $\text{HMQC}$ -Spektrums können folgende drei Fragmente zweifelsfrei konstruiert werden:



**Abb. 27:** Drei Fragmente des Naturstoffs **5451-2**

Im Massenspektrum wird das Molekülion bei 250  $m/z$  detektiert, mit den Informationen aus den NMR-Spektren und des IR-Spektrums kann so die Summenformel mit  $C_{15}H_{22}O_3$  bestimmt werden.

Aus den spektralen Daten kann die Struktur des Naturstoffs **5451-2** ermittelt werden. Die Literaturrecherche ergibt, dass es sich hierbei um Trichodermol handelt, welches in Abbildung 27 zu sehen ist.



**Abb. 28:** Trichodermol (**5451-2**)

Es wurde 1964 erstmals von Abrahamsson und Nilsson beschrieben<sup>[33]</sup>. Sie hatten das Sesquiterpen mit 4-Brombenzoesäure verestert, einen Einkristall gezüchtet und die Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt.

#### 2.1.4.3.3 *Naturstoff 5451-3*

Der Naturstoff **5451-2** wurde als gelbes Öl erhalten. Er löst sich gut in Lösungsmitteln mittlerer Polarität, wie Dichlormethan und Ethylacetat. Auf dem DC ( $R_f$ -Wert = 0.43,  $CH_2Cl_2$  : MeOH = 9 : 1) ist er gut mit dem  $H_2SO_4$ /Ethanol-Reagenz und im UV-Licht der Wellenlänge 254 nm detektiertbar und hat einen spezifischen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} - 39^\circ$  ( $c = 0.1$ ,  $CHCl_3$ ). Das IR-Spektrum zeigt eine scharfe Absorptionsbande bei  $3434\text{ cm}^{-1}$ , was ein Hinweis auf eine Hydroxygruppe ist und ein Bande bei  $1713\text{ cm}^{-1}$ , ein Indiz für eine Carbonylgruppe.

Dem  $^{13}C$ -NMR-Spektrum und dem DEPT 135-Experiment ist zu entnehmen, dass die Substanz aus drei Methyl-, sechs Methylen-, drei monooxygenierten Methin-, zwei olefinischen Methingruppen und sechs quartären Kohlenstoffatomen besteht. Der Vergleich



der eindimensionalen Spektren des Trichodermols (**5451-2**) und **5451-3** zeigt, dass beide Verbindungen einige fast identische Signale aufweisen. Die Daten sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass der Sekundärmetabolit **5451-3** wie die beiden vorher beschriebenen Naturstoffe ein 12,13-Epoxy-trichothec-9-en-Ringsystem als Grundgerüst besitzt.

**Tabelle 11:** Vergleich der  $^1\text{H-NMR}$ - und  $^{13}\text{C-NMR}$ -Dater der Naturstoffe **5451-2** und **5451-3**

Nr.	<b>5451-2</b>		<b>5451-3</b>	
	$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\delta/\text{ppm}$ )	$^1\text{H-NMR}$ ( $\delta/\text{ppm}$ )	$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\delta/\text{ppm}$ )	$^1\text{H-NMR}$ ( $\delta/\text{ppm}$ )
2	79.2 (d)	3.81 (d)	79.1 (d)	3.84 (d)
3	40.4 (t)	1.84 – 2.00 (m), 2.59 (dd)	40.1 (t)	1.73 – 2.1 (m), 2.59 (dd)
4	74.3 (d)	4.33 (dd)	74.7 (d)	4.56 (dd)
5	49.5 (s)	—	49.4 (s)	—
6	40.2 (s)	—	43.1 (s)	—
7	24.8(t)	1.84 – 2.00 (m)	21.6 (t)	1.73 – 2.1 (m)
8	28.4(t)	1.84 – 2.00 (m)	28.4 (t)	1.73 – 2.1 (m)
9	140.5 (s)	—	141.3 (s)	—
10	119.1 (d)	5.38 (d)	118.8 (d)	5.43 (d)
11	70.7 (d)	3.50 (d)	67.0 (d)	3.65 (d)
12	66.2 (s)	—	66.0 (s)	—
13	47.9 (t)	2.80 (d), 3.09 (d)	48.0 (t)	2.82 (d), 3.13 (d)
14	6.6 (q)	0.79 (s)	7.5 (q)	0.87 (s)
15	16.2(q)	0.85 (s)	63.2 (t)	3.94 (d), 4.19 (d)
16	23.6(q)	1.70 (s)	23.6 (q)	1.72 (s)
1'			166.5 (s)	—
2'			117.5 (d)	5.75 (m)
3'			158.0 (s)	—
4'			44.2 (t)	2.42 (t)
5'			60.4 (t)	3.81 (t)
6'			19.2 (q)	2.21 (d)

Auffällig gegenüber den Trichodermol (**5451-2**) ist die Carbonylschwingung im IR-Spektrum, die einer Resonanz im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum bei  $\delta = 166.5$  ppm entspricht, was ein Hinweis auf einen  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ester ist, zusätzlich sind zwei monooxygenierte Methylengruppen bei  $\delta = 60.4$  und  $63.2$  ppm zu erkennen. Ebenso fällt eine olefinische Methingruppe bei  $\delta = 117.5$ ,

der das Multiplett bei 5.75 ppm im Protonenspektrum entspricht, und eine tieffeldverschobenes, olefinisches, quartäres Kohlenstoffatom bei 158.0 ppm auf.

Die Molmasse der Substanz beträgt laut Massenspektrum 378 g/mol. Neben den 12,13-Epoxy-trichothec-9-en-Ringsystem lässt sich folgende Seitenkette anhand des H,H-Cosy- und des HMQC-Spektrums sowie der chemischen Verschiebung der Signale zweifelsfrei belegen.

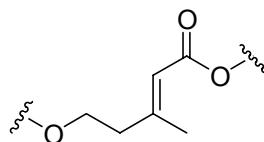


Abb. 29: Seitenkette des Naturstoffs 5451-3

Es lässt sich anhand der chemischen Verschiebung von C-15 zeigen, dass die Seitenkette mit diesem verbunden sein muss. Die Literaturrecherche ergibt, dass es sich bei diesem Naturstoff um Verrol handelt. Er wurde 1983 als Sekundärmetabolit des Pilzes *Myrothecium verrucaria* beschrieben<sup>[34]</sup>.

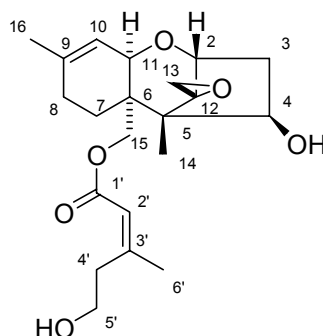


Abb. 30: Verrol (5451-3)

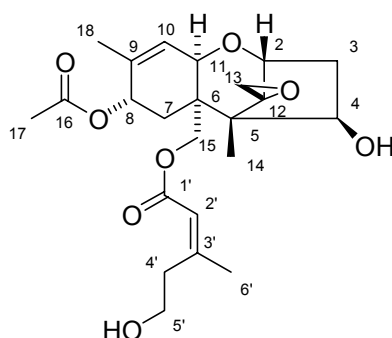
#### 2.1.4.3.4 Naturstoff 5451-4

Der Naturstoff 5451-4 wurde als farbloser, nadelförmig kristallisierender Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 82 °C erhalten. Er ist gut löslich in Lösungsmitteln mittlerer Polarität wie Ethylacetat und Dichlormethan. Auf dem DC ( $R_f$ -Wert = 0.41,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : MeOH = 9 : 1) ist er mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm gut detektierbar. Er hat einen spezifischen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = -29^\circ$  ( $c = 0.06$ , MeOH).

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum sind 23 Signale detektierbar. Mit Hilfe des DEPT 135-Experiments lassen sie sich vier Methyl-, drei monooxygenierten und drei aliphatischen Methylen-, vier Heteroatom-substituierten und zwei olefinischen Methingruppen und sieben quartären Kohlenstoffatomen zuordnen. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Naturstoffs 5451-4 unterscheidet

sich nur wesentlich an drei Signalen von dem des **5451-3**. Er hat eine monooxygenierte Methin-, eine Methylgruppe und ein quartäres Kohlenstoffatom (bei  $\delta = 171.3$  ppm) und eine Methylengruppe weniger. Werden die Signale des 12,13-Epoxytrichothec-9en-Ringsystems des Naturstoffs **5451-1** verglichen, so zeigt sich, dass dieser Naturstoff ebenfalls am Kohlenstoffatom 8 oxygeniert ist. Die Methylgruppe bei  $\delta = 21.4$  ppm und das quartäre Kohlenstoffatom bei  $\delta = 171.3$  ppm legen den Schluss nahe, dass es sich bei den Substituenten um eine Acetoxygruppe handeln muss.

Im Massenspektrum kann bei einer direkten chemischen Ionisation mit Ammoniak nur das  $[M+H]^+$ -Ion mit einer Masse von 379  $m/z$  detektiert werden. Im Zusammenhang mit den anderen Spektren kann daraus die Summenformel  $C_{23}H_{32}O_8$  erstellt werden.



**Abb. 31:** Struktur des Naturstoffs **5451-4**

Die Literaturrecherche zeigt, dass dieses Trichothecen-Derivat bisher noch nicht beschrieben wurde. Biochemisch kann es als Zwischenstufe zur Synthese des Verrucains L aufgefasst werden.

#### 2.1.4.4. Biologische Aktivität der Sekundärmetaboliten des Pilzstammes 5451

Aufgrund der geringen Menge von **5451-3** und **5451-4** wurden sie nicht getestet.

**Tabelle 12:** Agardiffusionstest der Naturstoffe **5451-1** und **5451-2**

Substanz	c [mg/mL]	Chl	Bm	Ec	Ust	Eur	Mm	Fu
<b>5451-1</b>	1	0.2 – 0.6	0	—	3.0	2.0	1.0	0
	10	0.4 – 1.0	0.1	—	3.5 – 4.0	2.5 – 3.0	1.2	0.5
<b>5451-2</b>	1	0.1	0	0	1.8 – 2.0	0	0.3 WH	0
	10	0.2	0	0	3.5 - 4	0.9 – 1.0	0.5 WH	0

Zahlen geben die Größe der Hemmhöfe in cm an. WH: Wachstumshemmung

Die beiden Naturstoffe fallen wegen ihrer hervorragenden fungiziden Wirkung gegen *Ustilago violacea* (Ust) auf. Verrucain L-Acetat (**5451-1**) zeigt ebenfalls sehr gute Wirkung gegen *Eurotium repens* (Eu) sowie gute Wirkung gegen *Mycothypha microspora* (Mm) und *Chlorella fusca*. Trichodermol (**5451-2**) zeigt gegen diese Organismen eine geringere Aktivität.

Von diesen Werten ausgehend kann festgestellt werden, dass die biologische Aktivität hauptsächlich auf die beiden getesteten Sekundärmetabolite zurückzuführen ist.

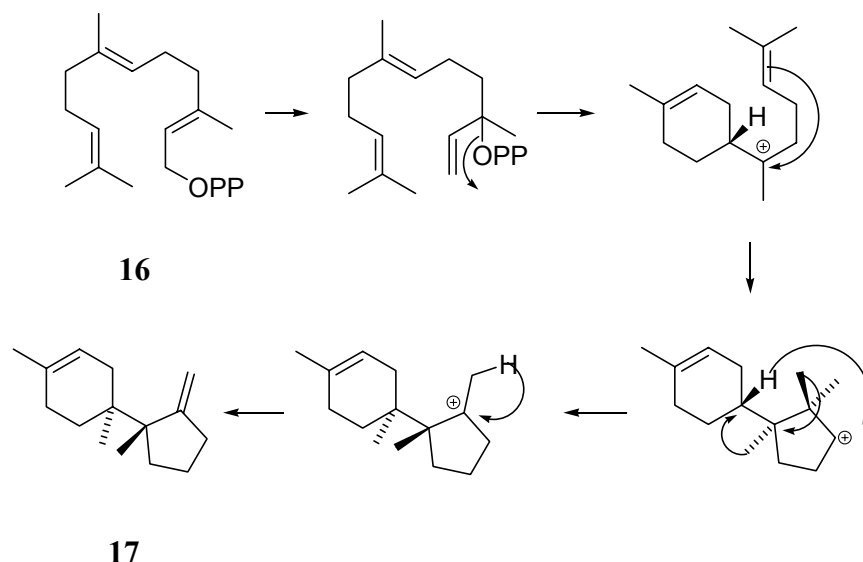
### 2.1.4.5. Biosynthese

Trichothecene sind Sesquiterpene, die als Sekundärmetabolite verschiedener Pilze z.B. Fusarium-, Myrothecium-, Trichothecium-, Trichoderma-, Stachybotris- und Cephalosporium-Arten vorkommen<sup>[35]</sup>. Ihnen gemeinsam ist das 12,13-Epoxy-trichothec-9-en-Ringsystem.

Bei den Trichothecenen handelt es sich um Kontaktgifte; sie führen beim Menschen zu Hautreizungen, Augenbindehaut-Entzündungen usw., und verursachen, wenn sie von Tieren mit dem Futter gefressen werden, Vergiftungen im Verdauungstrakt<sup>[36]</sup>. Die Wirkungsweise beruht auf der Bindung am Ribosom, wobei es zu einer Inhibierung der Peptidyl-Transferase kommt.

Nach der heute akzeptierten Hypothese, die von Ruzicka aufgestellt wurde und von einigen Autoren weiterentwickelt wurde, werden alle zyklischen Sesquiterpene durch Ionisation von Farnesylpyrophosphat (**16**) und anschließender Reaktion des allylischen Kations gebildet<sup>[37,38]</sup>.

Die Trichodien Synthase ist das Enzym, welches **16** in das Trichodien (**17**), dem biogenetischen Vorläufer aller Trichothecene, überführt<sup>[39]</sup>. Die Reaktion ist in Abbildung 32 dargestellt.



**Abb. 32:** Biosynthese des Trichodiens (**17**)

Im ersten Schritt geschieht eine Umlagerung, der eine Eliminierung des Pyrophosphatrests folgt. Das entstehende Kation bildet zuerst einen Fünfring, danach folgt eine 1,4-Hydrid-Verschiebung, der zwei 1,2-Methyl-Umlagerungen nachfolgen. Der letzte Schritt ist eine Deprotonierung zum Trichodien (**17**). Das Sesquiterpen **17** wird durch verschiedene Epoxidierungen und Hydroxylierungen in die entsprechenden Trichothecene übergeführt.

## 2.1.5. Naturstoffe aus Pflanzen

### 2.1.5.1. Beschreibung der Pflanze

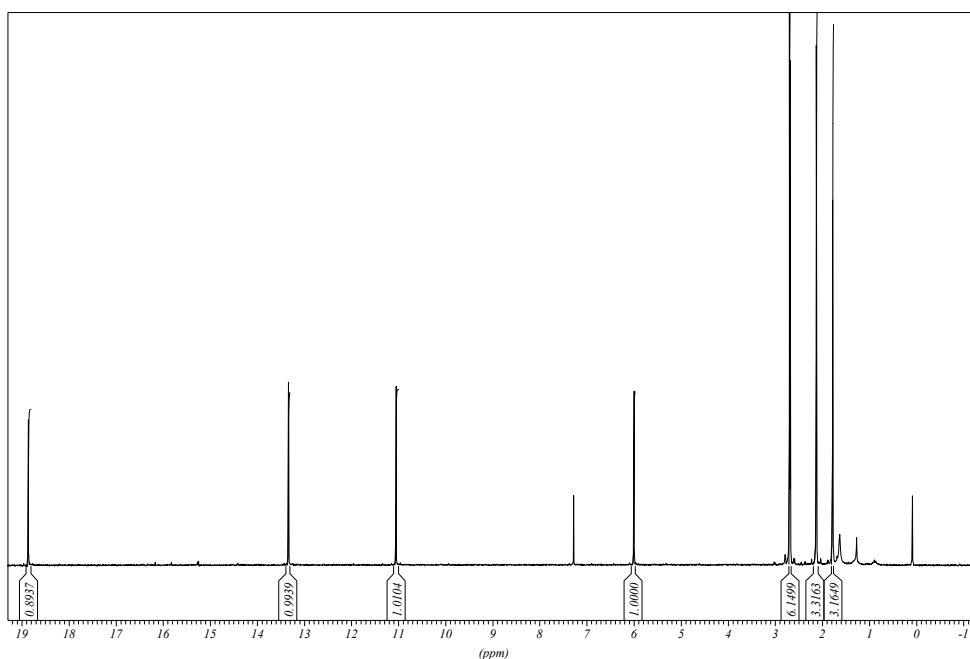
Die Isolierung der Substanz **P-1** gelang aus 1 g Rohextrakt der Flechte *Usnea dasypoga* Rohi. Welches von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Suwarso Priyono aus Indonesien gewonnen wurde. Die Flechten wurden von einem Baum der Art *Celtis philippinensis Blanco* vom Mount Kerinci, Sumatra, Indonesien gesammelt, getrocknet und anschließend mit Aceton extrahiert. Diese Flechten werden in der Indonesischen Volksmedizin zur Behandlung von Tuberkulose und Dysenterie verwendet. Aus dieser Pflanze konnte schon das Makrolacton Dasypogalacton isoliert werden<sup>[40]</sup>.

### 2.1.5.2. Strukturaufklärung

Der Naturstoff **P-1** kristallisiert in gelben Prismen mit einem Schmelzpunkt von 203 °C und besitzt einen Drehwert von  $[\alpha]_D^{20} = + 480^\circ$  ( $c = 0.16$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Dünnschichtchromatographisch ist der Naturstoff im UV-Licht bei 254 nm mit einem  $R_f$ -Wert von 0.61 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) detektierbar. Das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt acht intensive Singulett-Signale, denen aufgrund

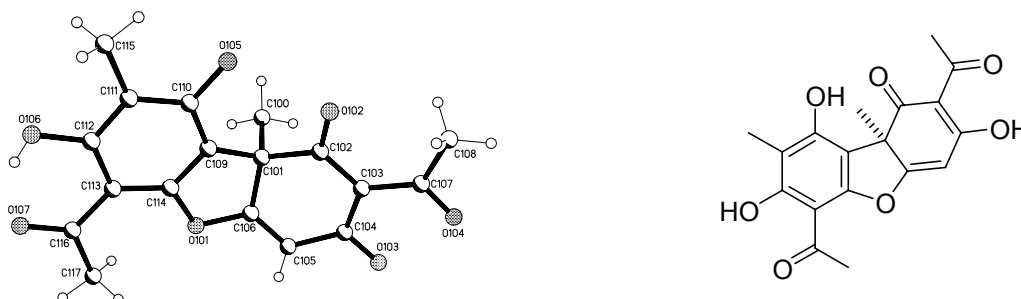
fehlender Kopplungen nur einzelne Gruppen zugeordnet werden können. Im Aliphatenbereich sieht man Signale für vier Methylgruppen 1.81, 2.16, 2.71 und 2.73 ppm. Die tieffeldverschobenen Resonanzen weisen auf einen Aromaten bzw. Carbonylgruppen als Bindungspartner hin. Die Protonensignale bei 11.08 und 13.37 ppm sind typisch für chelatisierte OH-Protonen. Das Signal bei 18.80 ppm ist ungewöhnlich weit zu tiefem Feld verschoben. Die korrekte Lage dieses Signals konnte erst ermittelt werden, nachdem die Einstrahlungsfrequenz am Spektrometer von 1225 Hz (6.13 ppm) auf 1800 Hz (9 ppm) geändert wurde. Da es bei der erst genannten Frequenz ein Signal bei -2 ppm gab, was auf eine zu kleine Spektralbreite zurückzuführen ist. In Abbildung 33 ist das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum dargestellt.

Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt 18 Signale. Aus dem DEPT-Experiment ist zu entnehmen, dass es sich hierbei um vier Methylgruppen, einer Methingruppe und 13 quartären Kohlenstoffatomen handelt. Fünf Signale treten im Verschiebungsbereich für Carbonylkohlenstoffatome auf. Die scharfen Carbonyl-Schwingungsbanden bei  $1693$  und  $1631\text{ cm}^{-1}$  im IR-Spektrum sind ebenfalls ein Indiz hierfür. Das quartäre Kohlenstoffatom bei  $\delta = 59.5$  ppm weist aufgrund seiner Tieffeldverschiebung darauf hin, dass es in  $\alpha$ -Position zu einer Carbonylgruppe oder Carboxylgruppe sein muss.



**Abb. 33:**  $^1\text{H}$ -NMR des Naturstoffs **P-1**

Die Konnektivität der Kohlenstoffatome kann mit den eindimensionalen NMR-Spektren nicht ermittelt werden. Aus einer Lösung des Naturstoffs in Chloroform lassen sich Einkristalle züchten, die röntgenstrukturanalytisch untersucht wurden. In Abbildung 34 ist die Röntgenstruktur dargestellt.



**Abb. 34:** links Röntgenstruktur von **P-1** im Kristall, rechts Strukturformel

Die Literaturrecherche ergibt, dass es sich bei **P-1** um (+)-*R*-Usninsäure handelt. Der Schmelzpunkt wird mit 201-204 °C und der Drehwert mit  $[\alpha]_D^{20} = 500^\circ(\text{CHCl}_3)$  angegeben.

Usninsäure kommt in vielen Flechten (Lichens) insbesondere in *Usnea*-Arten (daher der Name) in der (+) als auch in der (-) Form vor. Die Biosynthese von **P-1** verläuft vermutlich über eine oxidative Phenolkupplung der eine Michael-Addition folgt<sup>[41]</sup>.

### 2.1.5.3. Beschreibung der Pflanze

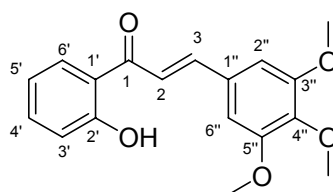
Der Naturstoff **P-2** wurde von Herrn Dr. M. S. Rao, Indien, aus der Pflanze *Crotalaria Prostrata* isoliert. Die Gattung *Crotalaria* gehört zu der Familie der Leguminaceae und Unterfamilie Papilionaceae. Untersuchungen der verschiedenen Arten dieser Gattung, die in der indischen Volksmedizin genutzt werden, ergaben bereits einige neue polyphenolische Verbindungen und Alkaloide<sup>[42, 43, 44]</sup>.

### 2.1.5.4. Strukturaufklärung

Der Naturstoff **P-2** wird als gelb-oranger, kristalliner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 145 °C erhalten. Er löst sich gut in Dichlormethan und Chloroform. Er hat einen  $R_f$ -Wert von 0.54 (PE : E = 4 : 1) und ist gut als gelber Fleck mit dem Auge zu erkennen. Im IR-Spektrum ist eine scharfe Absorptionsbande bei 1638  $\text{cm}^{-1}$  zu erkennen, die ein Indiz für einen  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ester oder ein -ungesättigtes Keton ist.

Im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sind Signale von 18 Protonen zu erkennen. Das Signal bei  $\delta = 12.88$  ppm ist charakteristisch für das chelierte Proton einer Hydroxygruppe. Im  $^{13}\text{C-NMR}$ -

Spektrum sind 15 Signale zu sehen. Mit Hilfe des DEPT 135-Experiments lassen sie sich zwei Methoxy-, sieben aromatischen und/oder olefinischen Methingruppen sowie sechs quartären Kohlenstoffatome zuordnen. Die Anzahl der Protonen, die anhand des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums und des DEPT 135-Experiments bestimmbar ist, stimmen nicht miteinander überein. Aus dem Massenspektrum lässt sich die Molmasse zu 314 g/mol ermitteln, aus der sich die Summenformel  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5$  ableiten lässt. Es müssen also drei Kohlenstoffatome mehr vorhanden sein, als im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zu detektieren sind. Das quartäre Kohlenstoffatom, welches bei 193.9 ppm absorbiert und die Methylen-Gruppe, die bei 146.1 ppm ein Signal ergibt, sind typisch für ein  $\alpha,\beta$ -ungesättigtes Keton. Die Konfiguration der Doppelbindung kann durch die Kopplungskonstante von 15.4 Hz, die die Protonen bei  $\delta = 7.56$  und  $7.87$  haben, eindeutig als *trans* bestimmt werden. Weiterhin sind zwei Doppel-Dubletts bei 7.06 und 7.92 zu sehen, die eine typische *ortho*-Kopplung von 8.5 bzw. 8.1 Hz und eine typische *meta*-Kopplung von 1.0 bzw. 1.5 Hz zeigen. Aus den Kreuzsignalen des H,H-Cosy-Spektrums kann man erkennen, dass das Doppel-Dublett bei 7.06 ppm mit dem Multiplett bei 7.53 ppm und das andere mit dem Multiplett bei 6.98 ppm koppelt. Es muss sich hierbei um einen 1,2-disubstituierten Benzolring handeln. Aufgrund der Tieffeldverschiebung eines Protons zu 7.92 ppm muss einer der Substituenten dem  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Keton und der zweite der Hydroxygruppe zuzuordnen sein. Aufgrund der Symmetrie muss der zweite Benzolring in Position 3,4 und 5 methoxyliert sein. Dieses geht auch aus dem  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum hervor. Eine Methoxygruppe ist um 4.7 ppm tieffeldverschoben. Der Naturstoff **P-2** ist also 1-(2'-Hydroxyphenyl)-3-(3'',4'',5''-trimethoxyphenyl)-2-propen-1-on.



**Abb. 35:** 1-(2'-Hydroxyphenyl)-3-(3'',4'',5''-trimethoxyphenyl)-2-propen-1-on (**P-2**)

Die Literaturrecherche zeigt, dass das Chalcon **P-2** bisher nur als Syntheseprodukt beschrieben ist<sup>[45]</sup>.



## 2.2. Ermittlung der absoluten Konfiguration mittels quantenchemischer Berechnung des Circular dichroismus (CD)

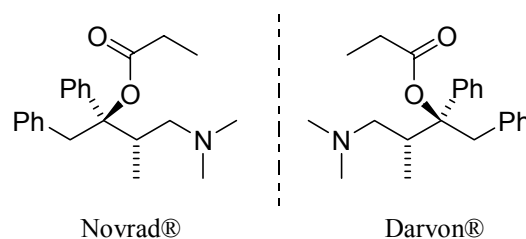
### 2.2.1. Allgemeines

Die genaue Kenntnis der Stereochemie biologisch aktiver Naturstoffe, insbesondere deren absolute Konfiguration, ist eine wichtige Voraussetzung z.B. zur Untersuchung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen.

Enantiomere stimmen in skalaren physikalischen Eigenschaften wie Schmelzpunkt, Siedepunkt, Dichte u.a. sowie in der chemischen Reaktivität gegenüber achiralen Reaktionspartnern überein. Ihre Reaktivität mit chiralen Reagenzien ist jedoch unterschiedlich.

Die Wirkung chiraler Substanzen, die als Pflanzenschutzmittel oder Arzneimittel, genutzt werden, ist ebenfalls abhängig von ihrer absoluten Konfiguration. Die Wirkorte der potentiellen Wirkstoffe wie Enzyme und Rezeptoren sind aus *L*-Aminosäuren aufgebaut, Nucleinsäuren haben ein Gerüst aus *D*-Ribose- bzw. *D*-Desoxyribose-Bausteinen und die meisten natürlich vorkommenden Zucker gehören der *D*-Reihe an. Es ist zu erwarten, dass sich zwei Enantiomere stark in ihrer Wirkstärke und Wirkqualität unterscheiden können, da diese maßgeblich von der Affinität und Selektivität des Wirkstoffes zum Wirkort abhängt.

Zur Klassifizierung dieses Phänomens bezeichnet man nach einem Vorschlag von Ariëns biologisch aktive Enantiomere als Eutomere, die inaktiven Enantiomeren als Distomere. Der Quotient der beiden Affinitäten oder Wirkungen definiert das eudismische Verhältnis.<sup>[46]</sup>



**Abb. 36:** Enantiomere Mannich-Basenderivate

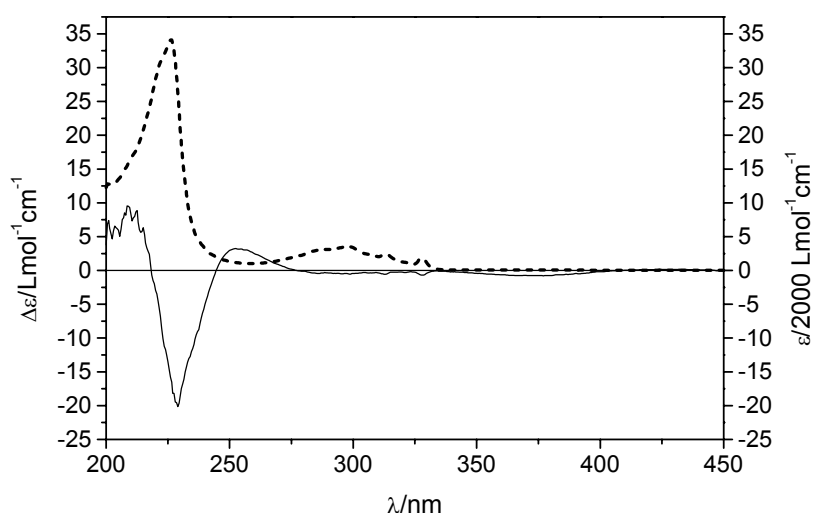
Als Beispiel für die unterschiedliche Wirkungsweise zweier Enantiomeren seien die in Abbildung 36 dargestellten Antipoden des Mannich-Basenderivats 1-Benzyl-3-(dimethylamino)-2-methyl-1-phenylpropylpropionats genannt, die zur Herstellung der Arzneimittel Novrad® und Darvon® dienen. Während Novrad® als hustenstillendes Präparat Anwendung findet, wird Darvon® als Schmerzmittel verwendet<sup>[47]</sup>.

Die relative Konfiguration lässt sich mittels NMR-Spektroskopie oder, wenn ein Einkristall vorhanden ist, aus Röntgenstrukturdaten ermitteln. Eine Methode der Konformationsanalyse mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie ist die Anwendung der Karplus-Kurve, die die Abhängigkeit der vicinalen Kopplungskonstante in einem gesättigten System vom Torsionswinkel beschreibt. Eine andere ist die Messung des NOEs (Nuclear Overhauser Effect); hiermit werden räumliche Wechselwirkungen gemessen<sup>[48]</sup>. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration ist oft deutlich schwieriger.

Eine effiziente Methode zur Aufklärung der absoluten Konfiguration ist die Messung des Circulardichroismus. Der Circulardichroismus ist als Differenz der molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten für links und rechts circular polarisiertes Licht definiert.

$$\Delta\varepsilon \equiv \varepsilon_L - \varepsilon_R$$

Aus der Definition geht hervor, dass CD nur innerhalb von Absorptionsbanden beobachtet werden kann. Üblicherweise handelt es sich dabei um Elektronenübergänge im VIS oder UV-Bereich; das Auftreten von CD innerhalb von Vibrationsbanden ist ebenfalls möglich. In ungeordneter Phase (in Lösung) tritt nur dann ein Cotton-Effekt auf, wenn die Moleküle der untersuchten Substanz chiral sind. In Abbildung 37 ist das UV-Spektrum und das zugehörige CD-Spektrum des Palmarumycins  $\text{C}_{10}$  dargestellt.



**Abb. 37:** — CD und --UV-Spektrum des Palmarumycins  $\text{C}_{10}$ ; rechte Skala  $\varepsilon$ , linke  $\Delta\varepsilon$

Die CD-Spektren von Enantiomeren sind spiegelbildlich zur x-Achse.

### 2.2.2. Berechnung der CD-Spektren und Aufklärung der absoluten Konfiguration

Die Rotationsstärke  $R_{0a}$  für einen Übergang  $0 \rightarrow a$  kann aus dem elektrischen und dem magnetischen Übergangsmoment mit folgendem Skalarprodukt berechnet werden<sup>[48]</sup>:

$$R_{0a} = \text{Im} \left\{ \langle \psi_0 | \hat{\mu} | \psi_a \rangle \cdot \langle \psi_a | \hat{m} | \psi_0 \rangle \right\} = \text{Im} \{ \mu_{0a} \cdot m_{a0} \} \quad (1)$$

Wobei Im dafür steht, dass nur der imaginäre Teil der komplexen Zahl betrachtet wird und  $\hat{\mu}$  (elektrisches Dipol-Übergangsmoment) und  $\hat{m}$  (magnetisches Dipol-Übergangsmoment) als Operatoren aufzufassen sind. Mit Hilfe der Beziehung (2) für  $\mu_{0a}$

$$\mu_{0a} = \frac{e\hbar}{im(E_a - E_0)} p_{0a} \quad (2)$$

ergibt sich:

$$R_{0a} = \text{Im} \left\{ \frac{e\hbar}{im(E_a - E_0)} \langle \psi_0 | \hat{p} | \psi_a \rangle \cdot \langle \psi_a | \hat{m} | \psi_0 \rangle \right\} = \text{Im} \left\{ \frac{e\hbar}{im(E_a - E_0)} p_{0a} \cdot m_{a0} \right\} \quad (3)$$

Formel (3) hat den Vorteil, dass sie auch für genäherte Wellenfunktionen  $\psi_0$  und  $\psi_a$  für Grundzustand und angeregte Zustände ursprungsunabhängig ist.  $\hat{p}$  ist der Operator des Impulses. Die Wellenfunktionen wurden durch CNDO/S-CI Berechnungen erhalten. Die Erweiterung CI bedeutet, dass der Grundzustand und angeregte Zustände berücksichtigt werden. Diese Berechnungen wurden mit dem Programmpaket BDZDO/MCDSPD, welches von Downing und Fleischhauer entwickelt wurde, durchgeführt.

Zur besseren Veranschaulichung werden die  $\Delta\varepsilon$ -Kurven aus den berechneten Rotationsstärken wie folgt erhalten:

$$\Delta\varepsilon(\nu) = \frac{6.909hc_0\nu\sqrt{\varepsilon_0}}{8\pi^2 1000N_A\sqrt{\mu_0}} \sigma_{0a}(\nu)R_{0a} \quad (4)$$

Dabei ist  $N_A$  die Avogadrozahl und  $\sigma_{0a}(\lambda)$  eine Gaußfunktion:

$$\sigma_{0a}(\lambda) = -\frac{1}{\Delta_a\sqrt{\pi}} e^{-\left(\frac{\lambda-\lambda_a}{\Delta_a}\right)^2} \quad (5)$$

Hierin sind  $\lambda_a$  die Wellenlänge des Maximums von  $\Delta\varepsilon$  und  $\Delta_a$  die Halbwertsbreite der Gauß-Kurve in nm. Es wurde für  $\Delta_a$  ein Wert von 5 nm gewählt.<sup>[49]</sup>

Zur Berechnung der Wellenfunktion ist die Kenntnis der räumlichen Struktur des Moleküls nötig. Bei Raumtemperatur besteht die Möglichkeit, dass neben der energetisch günstigsten Form auch andere Konformere mit ihr im Gleichgewicht vorliegen. Die Änderung der relativen Orientierung der Chromophore hat einen Einfluss auf das CD-Spektrum. Aus diesem Grund wird zuerst eine Konformationsanalyse an dem entsprechenden Molekül durchgeführt. Die Berechnung der einzelnen Konformere wurde mit dem Programm Spartan SGI Version 5.3 durchgeführt. Hierzu wurde entweder eine systematische oder eine Monte-Carlo-Suche mit dem Kraftfeld MMFF94 durchgeführt<sup>[50-54]</sup>. Anschließend wurden die Bildungsenthalpien  $\Delta_f H$  in kJ/mol semiempirisch mit dem AM1-Model berechnet, das ebenfalls Bestandteil des Programms Spartan ist.

Der Anteil, der einzelnen Konformere wurde nach :

$$\frac{N_i}{N_j} = e^{-\frac{E_i-E_j}{kT}} \quad (6)$$

berechnet. Berücksichtigt werden alle Konformere, die einen Energieunterschied bis 12 kJ/mol zum stabilsten Konformer haben, da diese bei einer Temperatur T von 298 K einen Anteil von mehr als einem Prozent haben.

Das CD-Spektrum für jedes Konformer wird berechnet und anschließend seinem Anteil gemäß der Boltzmannstatistik (6) zum endgültigen Spektrum addiert.

Im letzten Schritt wird das so berechnete CD-Spektrum mit dem gemessenen verglichen. Hier ergeben sich nun drei Möglichkeiten:

- i. Die beiden Spektren sind nahezu identisch.
- ii. Das berechnete und das gemessene Spektrum sind zur x-Achse spiegelbildlich
- iii. Die Spektren haben keine Ähnlichkeit.

In dem ersten Fall kann die absolute Konfiguration der Substanz zugeordnet werden. Im zweiten handelt es sich um das Enantiomer. Sollten, wie im Fall **iii**, die Spektren stark voneinander abweichen, so ist keine Aussage über die absolute Konfiguration möglich.

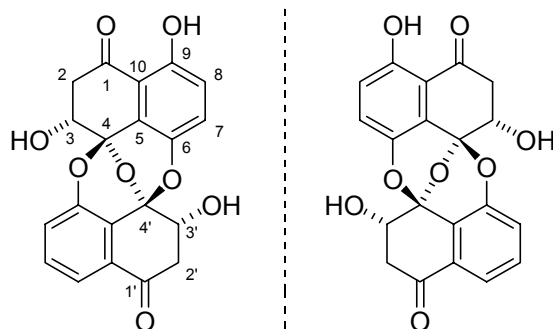
Bisher wurden mit dieser Methode die absolute Konfiguration verschiedener Naturstoffe und Syntheseprodukte aufgeklärt, darunter sind Doncopyllin, Ancistrocladin, Palmarumycine, Vismion H u. a.<sup>[55]</sup>.

### **2.2.3. Berechnung der absoluten Konfiguration der Preussomerine G – L**

Preussomerine sind Naturstoffe, deren Grundgerüst eine Bisspirobisnaphthalin-Einheit darstellt. Sie wurden erstmals 1990 von Gloer et al. beschrieben<sup>[56]</sup>. Die Autoren haben diese Sekundärmetabolite aus dem Pilz *Preussia isomera* Cain, der im Dung von Rindern lebt, isoliert<sup>[56,57]</sup>. Außerdem belegten sie, dass die Preussomerine A-F antifungische Eigenschaften besitzen. 1994 zeigte Singh et al., dass die Preussomerine G-I, die aus dem Endophyt *Hormonema dematioides* isoliert wurden, Inhibitoren der Farnesyl-Protein-Transferase (FPTase) sind<sup>[58]</sup>. FPTase-Inhibitoren sind potentielle Mittel gegen Krebsvarianten, die ein mutiertes *Ras*-Gen besitzen, wie z. B. den Bauspeicheldrüsenkrebs<sup>[59]</sup>. Frau Root, die ebenfalls im Arbeitskreis von Herrn Prof. Krohn arbeitet, isolierte die Preussomerine G-L aus einem bisher unbekanntem endophytischen Pilz, der in den Wurzeln von *Atropa belladonna* gefunden wurde.

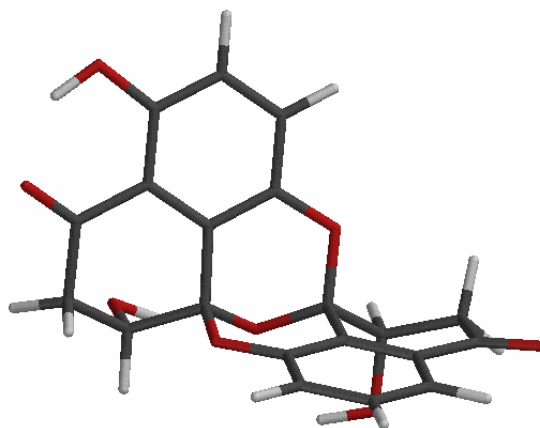
Bisher konnte nur die absolute Konfiguration des Preussomerins A bestimmt werden<sup>[56]</sup>. Hiervon war die relative Konfiguration durch eine Röntgenstruktur gesichert. Durch saure Hydrolyse wurde (-)-Regiolon, dessen absolute Konfiguration bekannt ist<sup>[60]</sup>, erhalten und somit konnten aufgrund der bekannten absoluten Konfiguration des chiralen Zentrums C1' die anderen Zentren zugeordnet werden.

Die relative Stereochemie des Preussomerins L konnte anhand der Röntgenstruktur bestimmt werden. Daher konnte es sich bei diesem Naturstoff entweder um das  $3R,3'R,4S,4S'$ -Enantiomer oder um das  $3S,3'S,4R,4'R$ -Enantiomer handeln. In Abbildung 38 sind die beiden Formen des Preussomerins L (**18**) dargestellt.

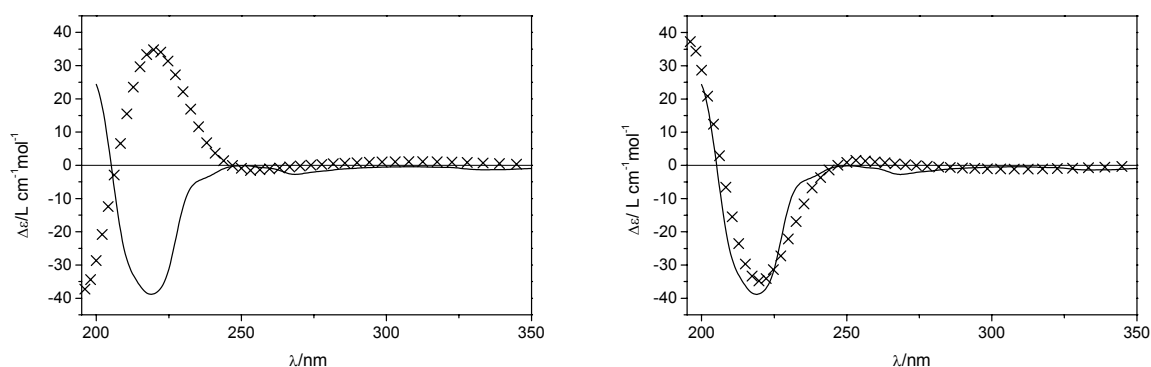


**Abb. 38** : Die zwei möglichen Enantiomeren des Preussomerins L (**18**)

Bei der Konformationsanalyse zeigte sich, dass die beiden aromatischen Ringe nahezu senkrecht zueinander angeordnet vorliegen. Die beiden hydroaromatischen Ringe liegen in einer quasi Boot-Konformation vor, was ebenfalls aus den Kopplungskonstanten des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums hervorgeht. Die Bisspiroketal-Einheit liegt als ein 1,3-überbrückter Sechsring vor. Hieraus lässt sich auch die relative Stabilität erklären, da es fast keine Ringspannungen im Molekül gibt. Insgesamt ist das Molekül aber wenig flexibel, allein die beiden OH-Gruppen sind frei drehbar. Die Monte-Carlo-Berechnungen zeigen zwar 4 Konformere, jedoch ist die Energiedifferenz zum stabilsten größer als 12 kJ/mol. Aus diesem Grund wird nur das CD-Spektrum des Konformers, welches in Abbildung 39 zu sehen ist, berechnet.

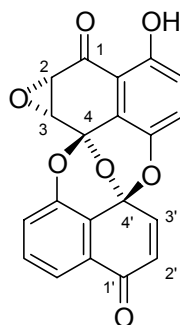


**Abb. 39**: Das energetisch günstigste Konformer des Preussomerins L (**18**)



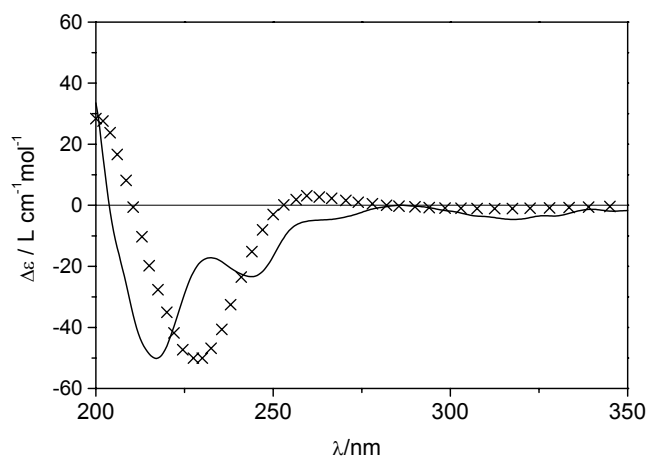
**Abb. 40:** × berechnetes, — gemessenes CD-Spektrum; links  $3S,3'S,4R,4'R$ -, rechts  $3R,3'R,4S,4'S$  Preussomerin L (**18**)

In Abbildung 40 sind das gemessene und für die beiden Enantiomeren berechneten CD-Spektren abgebildet. Das Spektrum des  $3R,3'R,4S,4'S$  Preussomerins L ist nahezu identisch mit dem gemessenen, während das  $3S,3'S,4R,4'R$  Enantiomer spiegelbildlich zum gemessenen Spektrum ist. Die absolute Konfiguration des Preussomerins L kann also eindeutig mit  $3R,3'R,4S,4'S$  zugeordnet werden.



**Abb. 41:** Preussomerin G (**19**)

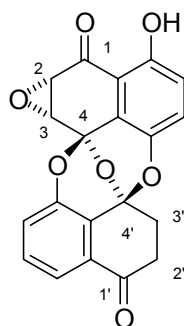
Die relative Konfiguration des Preussomerins G (**19**) war bereits durch eine Röntgenstrukturanalyse bekannt<sup>[58]</sup>. Da das von Frau Root isolierte den gleichen Drehwert hat, ist gesichert, dass es sich um den gleichen Naturstoff handeln muss. Hier ergibt die Konformationsanalyse, dass es sich um ein rigides Molekül handelt. Es wird nur ein Spektrum berechnet, da nur ein Konformer vorliegt. Abbildung 42 zeigt das für das  $2S,3R,4S,4'R$  berechnete und das gemessene CD-Spektrum.



**Abb. 42:** × berechnet, — gemessenes CD-Spektrum des Preussomerins G (**19**)

In Abbildung 42 ist zu erkennen, dass das berechnete CD-Spektrum eine Rotverschiebung von ca. 10 nm hat. Außerdem wird das zweite Minimum nicht berechnet. Der stark negative Cotton-Effekt bei 217 nm ist aber richtig berechnet worden, so dass auch hier die absolute Konfiguration mit  $2S,3R,4S,4'R$  angegeben werden kann.

Preussomerin H (**20**) unterscheidet sich von **19** nur dadurch, dass die Positionen 2' und 3' gesättigt vorliegen.



**Abb. 43:** Preussomerin H (**20**)

Das CD-Spektrum wurde wie beschrieben berechnet. In Abbildung 44 sind die beiden Spektren zu sehen. Das Gemessene zeigt einen stark negativen Cotton-Effekt bei 218 nm und eine Schulter bei 236 nm.



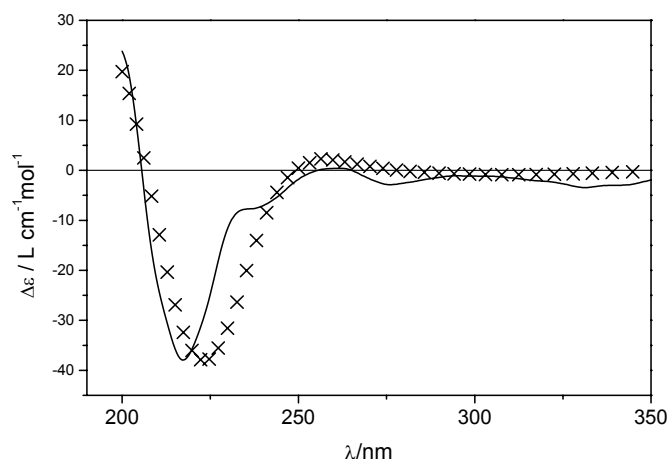


Abb. 44: × berechnet, — gemessenes CD-Spektrum des Preussomerins H (**20**)

Hier ist wiederum eine gute Übereinstimmung der beiden Kurvenverläufe erkennbar. Die absolute Konfiguration kann mit  $2S,3R,4S,4'S$  bestimmt werden.

Die Preussomerine I – K (**21** – **23**) haben als Gemeinsamkeit, dass die 3'-Position des „unteren“ Ringes substituiert ist. Es wurde bereits darüber spekuliert, ob diese Produkte durch eine Michael-Addition an das Preussomerin G (**19**) während der Isolierung oder während der Trennung entstanden sein könnten. Experimentell konnte jedoch unter den Bedingungen, welche zur Isolierung eingehalten wurden, keine Michael-Addition festgestellt werden<sup>[58]</sup>. Die relative Konfiguration des C3' konnte anhand von Kopplungskonstanten ermittelt werden, demnach ist der Substituent an C3' pseudoaxial<sup>[58,61]</sup>.

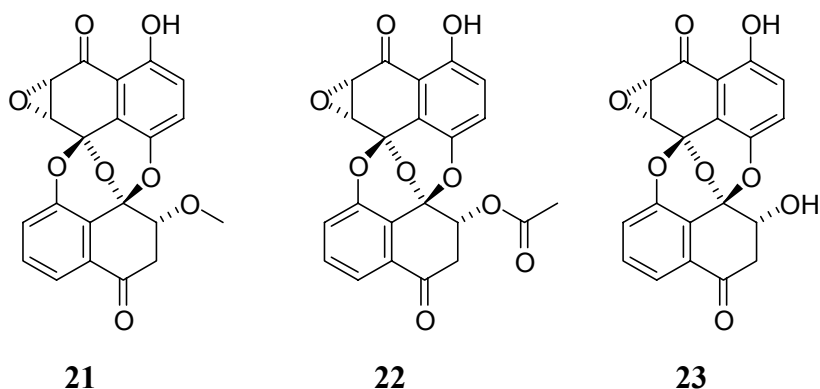


Abb. 45: Preussomerine I – K (**21** – **23**)

Die Spektren werden wie beschrieben berechnet. In den Abbildungen 46 – 48 sind die berechneten (×) und die gemessenen Spekten (—) der Preussomerine **21-23** abgebildet.

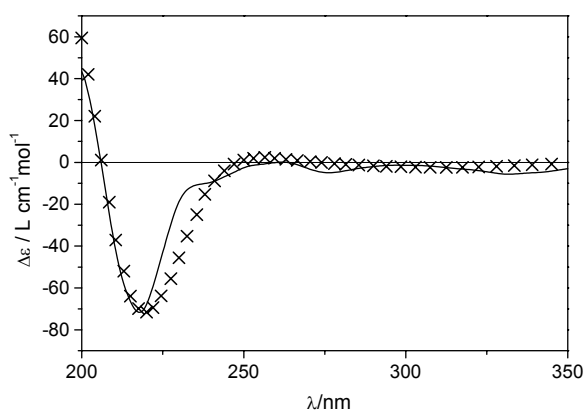


Abb. 46: Spektren des Preussomerins I (21);

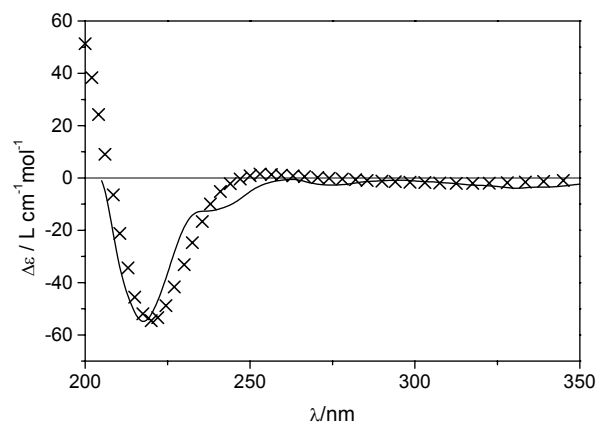


Abb. 47: Spektren des Preussomerins J (22)

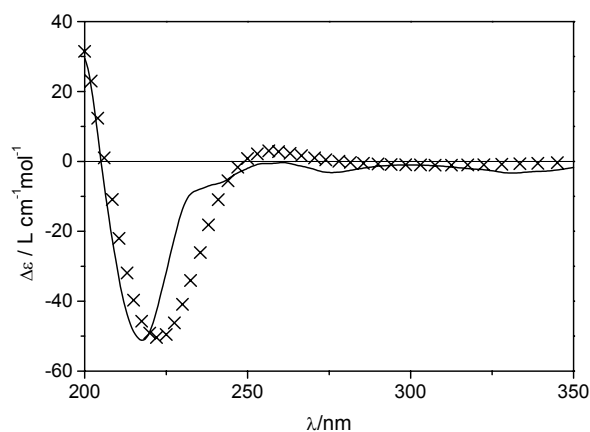


Abb. 48: Spektren des Preussomerins K (23)

Die Spektren haben große Ähnlichkeit mit den quantenchemisch berechneten. Die absolute Konfiguration der drei Verbindungen ist an allen stereogenen Zentren gleich und kann mit 2S,3R,3'R,4S,4S' angegeben werden.

In Tabelle 13 sind die CD-Maxima der Preussomerine noch einmal zusammengefasst. Zur Aufnahme der CD-Spektren wurde eine methanolische Lösung der Preussomerine bei 25 °C verwendet.

**Tabelle 13: CD-Maxima der Preussomerine**

Preussomerin G ( <b>19</b> )		Preussomerin H ( <b>20</b> )		Preussomerin I ( <b>21</b> )	
$\lambda/\text{nm}$	$\Delta\epsilon/\text{L cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$	$\lambda/\text{nm}$	$\Delta\epsilon/\text{L cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$	$\lambda/\text{nm}$	$\Delta\epsilon/\text{L cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$
369	-2.75	331	-3.44	332	-5.62
318	-4.62	276	-2.87	277	-4.92
264s*	-4.79	262	0.43	262	0.11
244	-23.38	236s	-7.70	238s	-10.22
217	-50.15	218	-37.95	218	-71.63
Preussomerin J ( <b>23</b> )		Preussomerin K ( <b>22</b> )		Preussomerin L ( <b>18</b> )	
$\lambda/\text{nm}$	$\Delta\epsilon/\text{L cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$	$\lambda/\text{nm}$	$\Delta\epsilon/\text{L cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$	$\lambda/\text{nm}$	$\Delta\epsilon/\text{L cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$
331	-3.95	331	-3.35	334	-1.37
275	-2.72	276	-3.19	269	-2.73
237s	-12.67	240	-6.53	237s	-4.31
218	-54.81	218	-51.16	219	-38.82

\* s steht als Abkürzung für Schulter.

#### 2.2.4. Berechnung der absoluten Konfiguration der Xyloketale A und D

Die Xyloketale A (**24**) und D (**25**) wurden von Yongcheng Lin und Mitarbeitern aus einer *Xylaria* Art (Ascomycota) isoliert<sup>[62]</sup>. Dieser Pilz ist in den Mangroven des südchinesischen Meeres heimisch. In ersten biologischen Untersuchungen zeigte sich, dass Xyloketal A eine Inhibierung der Cholin-Acetylase bewirkt. Bei den Xyloketalen handelt es sich um eine neue Naturstoffklasse, deren gemeinsames Strukturelement ein bicyclisches Ketal ist.

Die relative Konfiguration des Xyloketals D (**25**) wurde mittels einer Röntgenstruktur erhalten. Aus dieser ergibt sich, dass die chiralen Zentren 2, 5 und 6 entweder eine *S,S,S*-Konfiguration oder die spiegelbildliche *R,R,R*-Konfiguration haben.

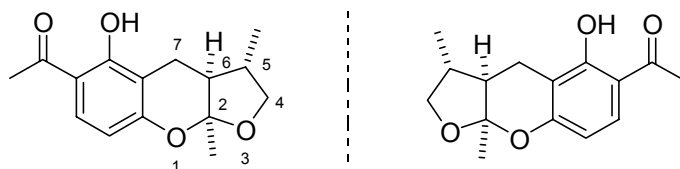


Abb. 49: Die beiden Enantiomere des Xyloketals D (**25**)

Zur Berechnung des CD-Spektrums wurde das S,S,S-Enantiomer einer Konformationsanalyse unterzogen. Es zeigt sich, dass der Fünfring relativ starr ist und nur der Sechsring eine gewisse Flexibilität aufweist. Die Position der Acetylgruppe wurde so festgelegt, dass sie sich in einer Ebene mit dem Benzolring befindet. Nur so ist eine optimale Chelatisierung des Protons der Hydroxygruppe möglich; diese geht aus den  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum hervor. Das Signal für dieses Proton liegt bei 13.09 ppm. Die Rechnung ergibt zwei Konformere von denen die CD-Spektren und die Bildungsenthalpien berechnet werden. In Abbildung 50 sind die beiden Konformere dargestellt. Der Sechsring von **25**<sub>1</sub> liegt in einer Halbsesselform vor, der von **25**<sub>2</sub> in der Bootform.

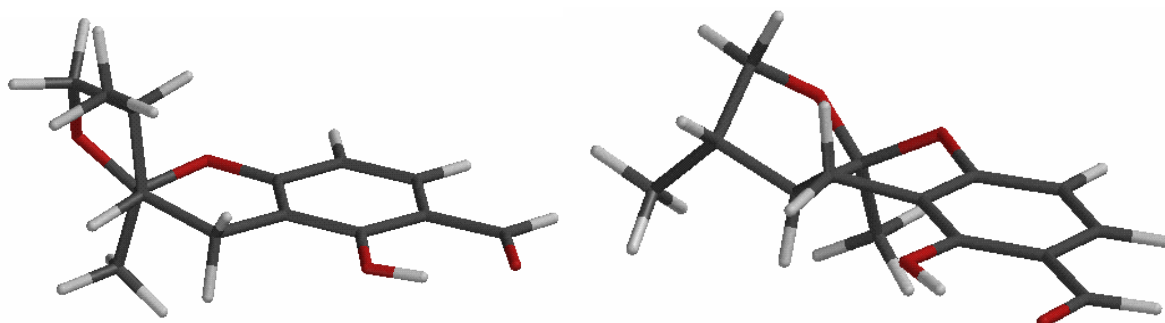
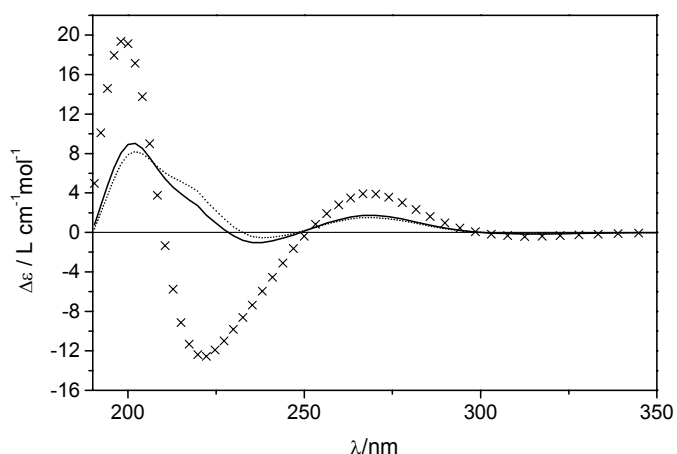


Abb. 50: zwei Konformere des Xyloketals D (**25**)

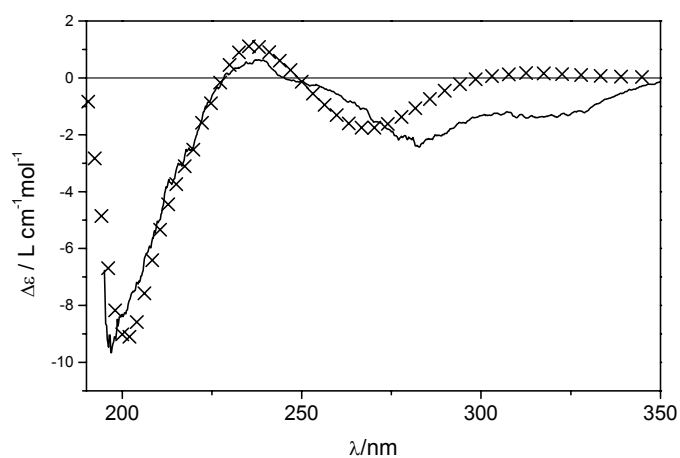
Anschließend werden die CD-Spektren ihrem Anteil nach addiert, der aus der Boltzmannstatistik hervorgeht. In Abbildung 51 werden die beiden CD-Spektren der Konformere und das Spektrum, welches nach der Boltzmann-gewichtung erhalten wird, gezeigt.



**Abb. 51:** Spektren der beiden Konformere (×) und (- -) sowie das gewichtete Spektrum (—)

Die deutlichen Unterschiede der Spektren der beiden Konformere veranschaulichen, wie wichtig die Konformationsanalyse bei der quantenchemischen Berechnung von CD-Spektren ist.

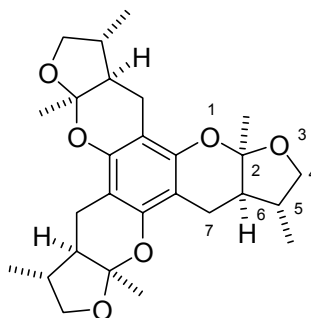
Das CD-Spektrum des Enantiomeren wird durch Multiplikation mit  $-1$  erhalten. In der Abbildung 52 ist das gemessene und das des  $2R,5R,6R$  Xyloketal D dargestellt. Der experimentell erhaltene Kurvenverlauf zeigt bei 197 nm einen stark negativen Cotton-Effekt und einen schwach positiven bei 372 nm.



**Abb. 52:** × berechnet, — gemessenes CD-Spektrum des Xyloketal D (25)

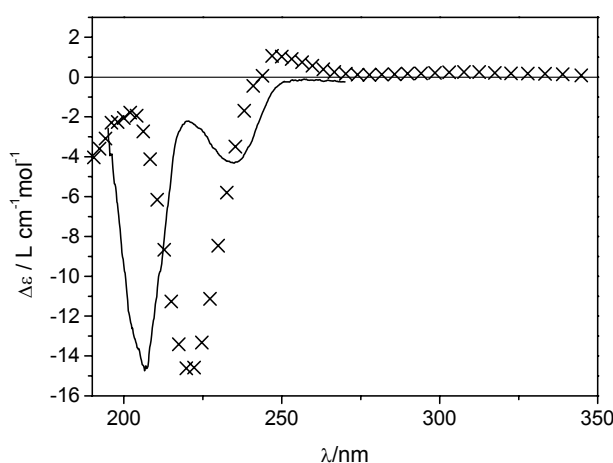
Die beiden Spektren stimmen miteinander gut überein, so dass hier die absolute Konfiguration des Naturstoffs **25** mit  $2R,5R,6R$  angegeben werden kann.

Aus der Röntgenstrukturanalyse des Xyloketal A (**24**) ist bekannt, dass auch hier die relative Konfiguration der Stereozentren  $2R^*$ ,  $5R^*$  und  $6R^*$  sind.



**Abb. 53:** Xyloketal A (**24**)

Die NMR-Untersuchungen zeigen, dass das Molekül in Lösung ein  $C_3$ -Symmetrieelement besitzt. Aus diesem Grund muss die relative Konfiguration der anderen Stereozentren ebenfalls  $R^*$  sein. Bei der Konformationsanalyse zeigt sich, dass der Fünfring relativ starr ist und nur der Sechsring eine gewisse Flexibilität aufweist. Die CD-Spektren der einzelnen Konformere werden berechnet und gemäß ihres Gleichgewichtsanteils addiert. Das Resultat der Berechnungen ist in der Abbildung 54 dargestellt



**Abb. 54:** × berechnetes und — gemessenes CD-Spektrum des Xyloketal A (**24**)

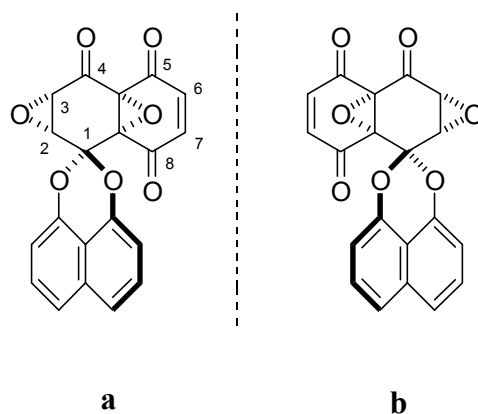
Die Übereinstimmung zwischen dem gemessenen und dem berechneten Spektrum sind hier nicht so groß wie es für das Xyloketal D (**25**) der Fall ist. Allerdings ist auch hier der stark negative Cotton-Effekt bei 206 nm richtig berechnet worden, aber um 13 nm bathochrom verschoben. Der Cotton-Effekt rührt von den  $^1B_{a,b}$ -Übergang im UV-Spektrum bei 210 nm her. Deshalb ist die absolute Konfiguration der Stereozentren *R*.

### 2.2.5. Berechnung der absoluten Konfiguration der Palmarumycine **C<sub>9</sub>**, **C<sub>10</sub>** und **C<sub>12</sub>**

Palmarumycine sind Naturstoffe, bei denen eine Spironaphthodioxin-Untereinheit, von einigen Ausnahmen abgesehen, mit einer Dekalin-Einheit verknüpft ist. Biosynthetisch sind die Palmarumycine eng mit den Preussomerinen verwandt. Einige Vertreter dieser Naturstoffklasse zeigen interessante biologische Aktivitäten. Auf der AACR-Tagung 1994 (American Association for Cancer Research) wurde über die Antitumor-Wirkung einiger Vertreter dieser Naturstoffklasse berichtet<sup>[63]</sup>. Die Palmarumycine **C<sub>9</sub>** (**26**), **C<sub>10</sub>** (**27**) und **C<sub>12</sub>** (**28**) wurden aus dem unidentifizierten Pilz *Coniothyrium* isoliert und zeigen antifungische und antibakterielle Eigenschaften<sup>[64]</sup>. Bisher ist nur die relative Stereochemie dieser beiden Naturstoffe bekannt.

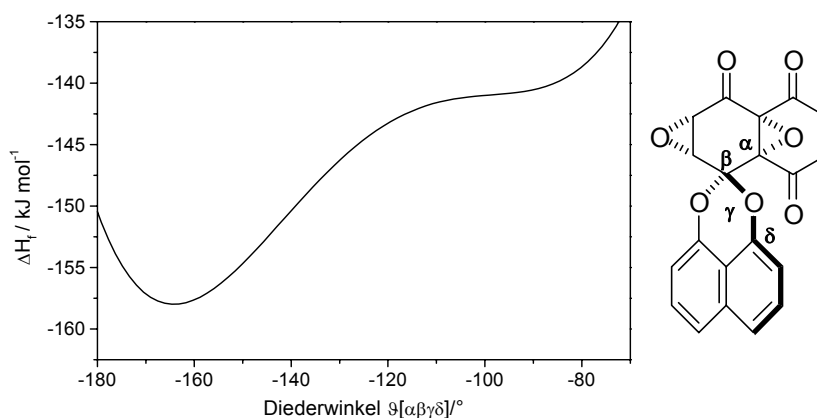
Die absolute Konfiguration der Palmarumycine **C<sub>2</sub>**, **C<sub>3</sub>**, **CP<sub>3</sub>**, **CP<sub>4a</sub>**, und **CP<sub>5</sub>** konnte bereits durch quantenchemische Berechnung ihrer CD-Spektren und dem Vergleich mit den gemessenen CD-Spektren aufgeklärt werden<sup>[49,65]</sup>. Die absolute Stereochemie der Diepoxine  $\eta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\sigma$  und  $\varphi$  wurde ebenfalls durch CD-spektroskopische Methoden aufgeklärt<sup>[66]</sup>. Hierzu wurde das Diepoxins  $\eta$  in das *bis*-Dimethylaminobenzoat übergeführt. Anschließend wurde das CD-Spektrum gemessen und anhand der positiven Exciton-Kopplung die absolute Konfiguration aufgeklärt.

Aus den NMR-Daten des Sekundärmetaboliten **C<sub>9</sub>** kann geschlossen werden, dass die beiden Oxiranringe *cis* zu einander stehen. Dieses wurde bei den oben erwähnten Diepoxinen ebenfalls festgestellt. Aus diesem Grund kann der Naturstoff **C<sub>9</sub>** (**26**) entweder als *2R,3S,4aS,8aR*-Enantiomer **a** oder als *2S,3R,4aR,8aS*-Enantiomer **b** vorliegen (Abb. 55).



**Abb. 55:** Mögliche Enantiomere **a** und **b** des Palmarumycins C<sub>9</sub> (**26**)

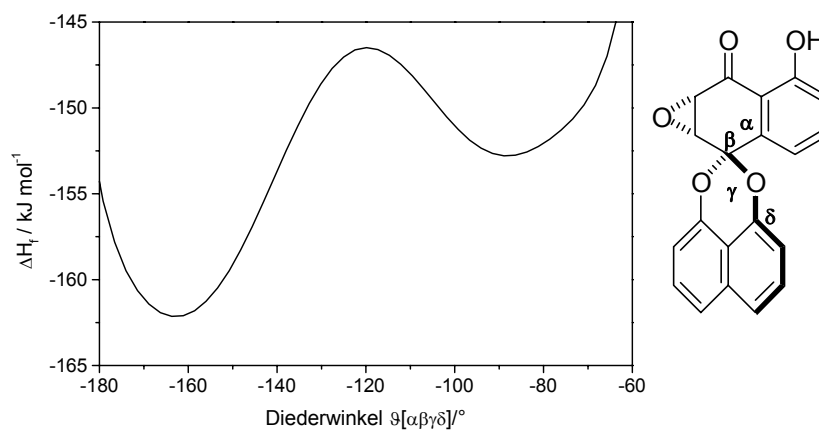
Die Konformationsanalyse zeigte, dass der die beiden Oxiranringe tragende „obere“ Molekülteil als rigide anzusehen ist. Der Naphthylrest hingegen kann eine Faltbewegung durchführen. In Abbildung 56 wird die berechnete Abhängigkeit der Bildungsenthalpie  $\Delta H_f$  vom Diederwinkel  $\vartheta$  dargestellt.



**Abb. 56:** Bewegungskordinate der Faltbewegung um den Diederwinkel  $\vartheta$  des Palmarumycins C<sub>9</sub> (**26**)

Es ist nur ein Energieminimum zu erkennen. Bei der Faltbewegung zum anderen Teil der „oberen“ Molekülhälfte ist ein Sattelpunkt zu erkennen. Dieses steht im Gegensatz zu den Berechnungen, die für das Palmarumycin C<sub>2</sub> durchgeführt worden sind; hier konnten zwei Minima festgestellt werden. Die Minima sind in Abbildung 57 zu sehen, es wird die Bildungsenthalpie  $\Delta H_f$  in Abhängigkeit vom Diederwinkel  $\vartheta$  gezeigt.

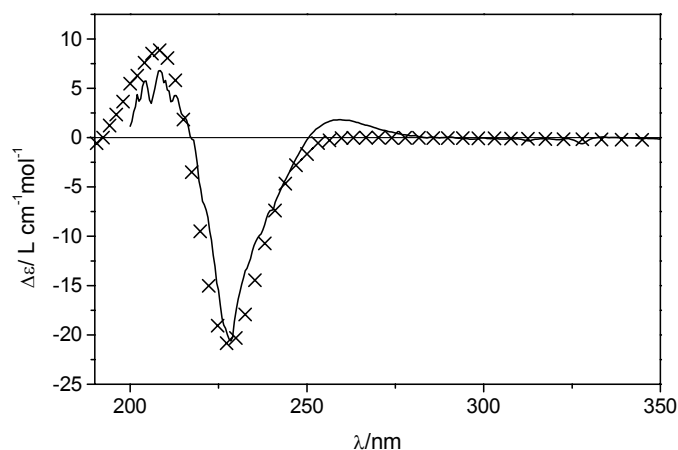




**Abb. 57:** Bewegungskordinate der Faltbewegung um den Diederwinkel  $\vartheta$  des Palmarumycins  $C_2$

Das unterschiedliche Verhalten kann damit erklärt werden, dass das im Palmarumycin  $C_9$  am Kohlenstoffatom C-8 vorhandene Carbonylsauerstoffatom einen größeren Raumbedarf hat, als das Wasserstoffatom am C-8 des Palmarumycins  $C_2$  und es bei der Faltbewegung in diese Richtung zu sterischen Wechselwirkungen kommt.

Für die Berechnung des CD-Spektrums ist für das Palmarumycin  $C_9$  nur ein Konformer zu berücksichtigen, da die Differenz zwischen dem Energieminimum und dem Sattelpunkt größer als 12 kJ/mol ist. In Abbildung 58 sind das gemessene und das berechnete Spektrum für das  $2R,3S,4aS,8aR$ -Enantiomer dargestellt.

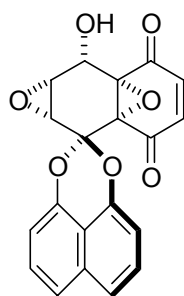


**Abb. 58:** gemessenes (—) und berechnetes (×) CD-Spektrum des Palmarumycins  $C_9$  (**26**)

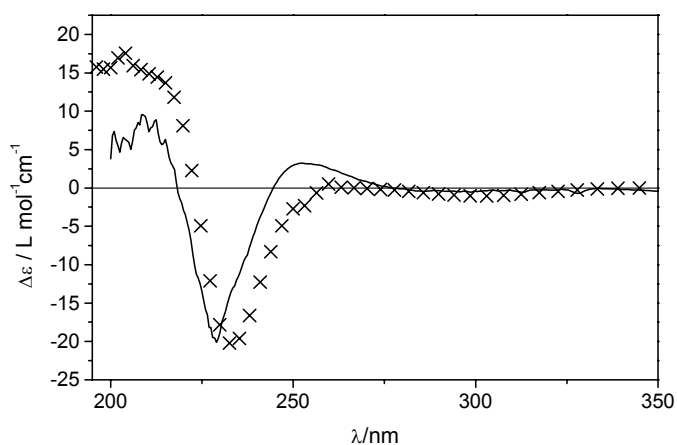
Das CD-Spektrum zeigt einen schwach positiven Cotton-Effekt bei 256 nm und einen stark negativen Cotton-Effekt bei ca. 227 nm, welcher von einem  $^1B_b$ -Übergang des Naphthalinrings stammt.

Beide Spektren zeigen eine deutliche Übereinstimmung, so dass die absolute Konfiguration des Naturstoffs mit  $2R,3S,4aS,8aR$  zugeordnet werden kann.

Ähnliche Ergebnisse werden für das Palmarumycin  $C_{10}$  (**27**) erhalten, welches auch als Diepoxin  $\phi$  bekannt ist<sup>[67]</sup>. Die absolute Konfiguration wurde bereits von Schlingmann et al. aufgeklärt<sup>[67]</sup>.



**Abb. 59:** Palmarumycin  $C_{10}$  (**27**)

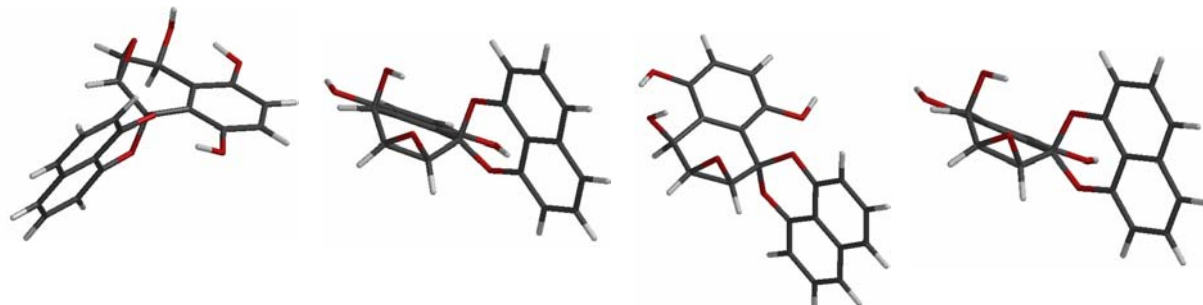


**Abb. 60:** Palmarumycin  $C_{10}$  (**27**); sein gemessenes (—) und berechnetes (×) CD-Spektrum

In Abbildung 60 ist das gemessene und das berechnete CD-Spektrum des ( $2R,3R,4S,4aS,8aR$ ) Palmarumycins  $C_{10}$  (**27**) dargestellt. Beide Spektren zeigen einen nahezu identischen Verlauf. Hiermit wird die von Schlingmann angegebene absolute Konfiguration des Palmarumycins  $C_{10}$  bzw. Diepoxins  $\phi$  bestätigt.

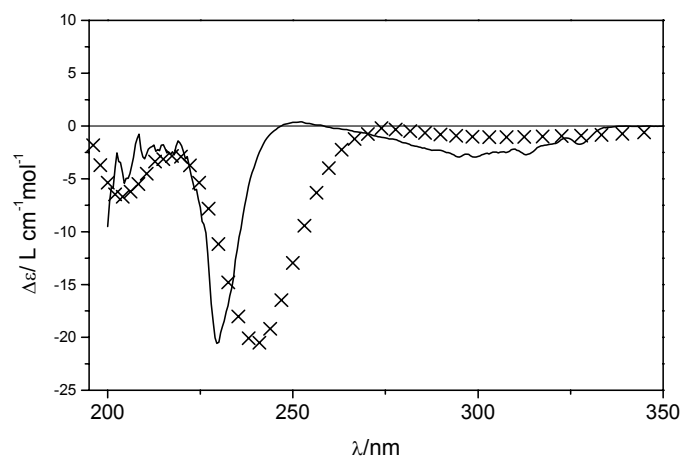
Die Konformationsanalyse des Palmarumycins  $C_{12}$  (**28**) zeigte, dass der Naphthylrest eine Faltbewegung ausführen kann, die drei Hydroxygruppen frei drehbar sind und der den Oxiranring tragende Sechsering eine gewisse Flexibilität hat. Die Berechnung ergab, dass vier

Konformere bei der Berechnung zu berücksichtigen sind. Bei zwei dieser Konformere liegt der den Oxiranring tragende Sechsering in einer quasi Bootform vor und bei zwei in einer fast planaren Anordnung.



**Abb. 61:** Vier für die Berechnung des CD-Spektrums relevanten Konformere des Palmarumycins  $C_{12}$  (**28**)

Das endgültige Spektrum wurde durch Addition der CD-Spektren der vier Konformere gemäß ihres Anteils, der aus der Boltzmann-Statistik resultiert, erhalten. Abbildung 62 illustriert das für das  $2R,3R,4R$ -Enantiomere berechnete und das gemessene CD-Spektrum.



**Abb. 62:** gemessenes (—) und berechnetes (×) CD-Spektrum des Palmarumycins  $C_{12}$  (**28**)

Auch hier zeigt das CD-Spektrum einen stark negativen Cotton-Effekt bei 230 nm, der von einem  ${}^1B_u$ -Übergang des Naphthalinrings stammt und einen schwach negativen bei ca. 300 nm. In der Abbildung ist eine gute Übereinstimmung der beiden Spektren zu sehen, allerdings ist bei dem Minimum des berechneten Spektrums eine Rotverschiebung um ca. 11 nm zu erkennen. Die absolute Konfiguration kann mit  $2R,3R,4R$  zugeordnet werden.

In Tabelle 14 sind die CD-Daten der oben beschriebenen Palmarumycine zusammengefasst. Zur Messung der Spektren wurde eine methanolische Lösung des jeweiligen Palmarumycins verwendet. Die Messtemperatur betrug 25 °C.

**Tabelle 14:** CD-Maxima der Palmarumycine

Palmarumycin C <sub>9</sub>		Palmarumycin C <sub>10</sub>		Palmarumycin C <sub>12</sub>	
$\lambda / \text{nm}$	$\Delta\epsilon / \text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda / \text{nm}$	$\Delta\epsilon / \text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda / \text{nm}$	$\Delta\epsilon / \text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
228.5	-20.62	229	-20.15	229.5	-20.57
259	1.82	252	3.24	249.5	0.31
		293	-0.53	299.5	-2.93
		373	-0.75		

## 2.3. Synthesen

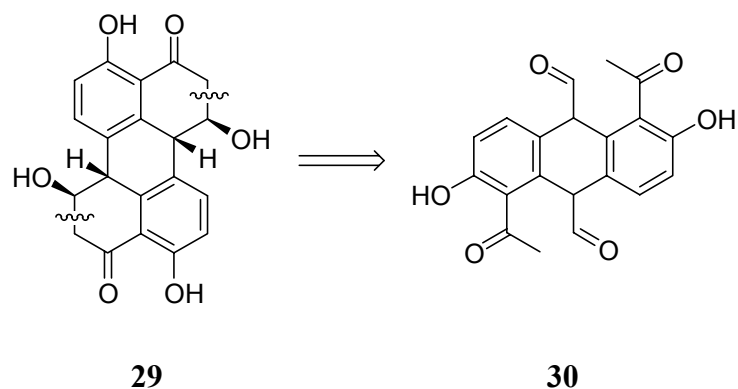
### 2.3.1. Erste Syntheseschritte zur Darstellung von Stemphyerylenol

#### 2.3.1.1. Motivation

Der Naturstoff Stemphyerylenol (**29**) gehört zu den Perylenchinonen. Er wurde in unserer Arbeitsgruppe als Sekundärmetabolit der Pilze *Monodictys fluctuata* und *Pleospora herbarium* isoliert<sup>[26,68]</sup>. Er fiel im Agardiffusionstest als auch im Photosyntheseaktivitätstest durch seine starke herbizide Wirkung auf. Bisher wurde **29** noch nicht synthetisch hergestellt, obwohl dieser Naturstoff schon seit 1986 bekannt ist<sup>[69]</sup>.

#### 2.3.1.2. Syntheseplanung

Bei der Strukturanalyse des Stemphyerylenols (**29**) fallen die beiden  $\beta$ -Hydroxyketone auf. Diese Funktionalität kann durch eine Aldolreaktion aufgebaut werden. Abbildung 63 zeigt den gedanklichen Schnitt, der das Molekül in einen Dialdehyd **30** zerlegt.



**Abb. 63:** Retrosynthese des Stemphyperylenols (**29**)

Als Ausgangsverbindung für die Synthese steht Anthraflavonsäure (**31**) zur Verfügung. Im ersten Schritt wird **31** zum 2,6-Dihydroxyanthracen (**32**) reduziert, dessen Hydroxygruppen geschützt werden. Anschließend folgt eine Friedel-Crafts-Acylierung zu (**34**). Hier besteht die Möglichkeit, dass die Acylierung an beiden *ortho*-Positionen stattfinden kann. Die Literaturrecherche ergab, dass diese Reaktion bereits von Cameron et al. regioselektiv durchgeführt wurde<sup>[70]</sup>. Durch eine Diels-Alder-Reaktion und nachfolgender Verseifung des entsprechenden Carbonats (**35**) wird es in das Diol (**36**) übergeführt, das durch eine Natriumperjodatspaltung in den Dialdehyd (**37**) umgewandelt wird. Aufgrund der Diels-Alder-Reaktion sollten die beiden Aldehydgruppen *cis* zueinander stehen und so nur zwei von vier möglichen Stereoisomeren gebildet werden. Hierauf folgt die Aldol-Addition, wodurch die beiden Sechsringe gebildet werden. Als letzter Schritt folgt die Entschützung der Hydroxygruppen mittels  $\text{AlCl}_3$  zum Stemphyperylenol (**29**).

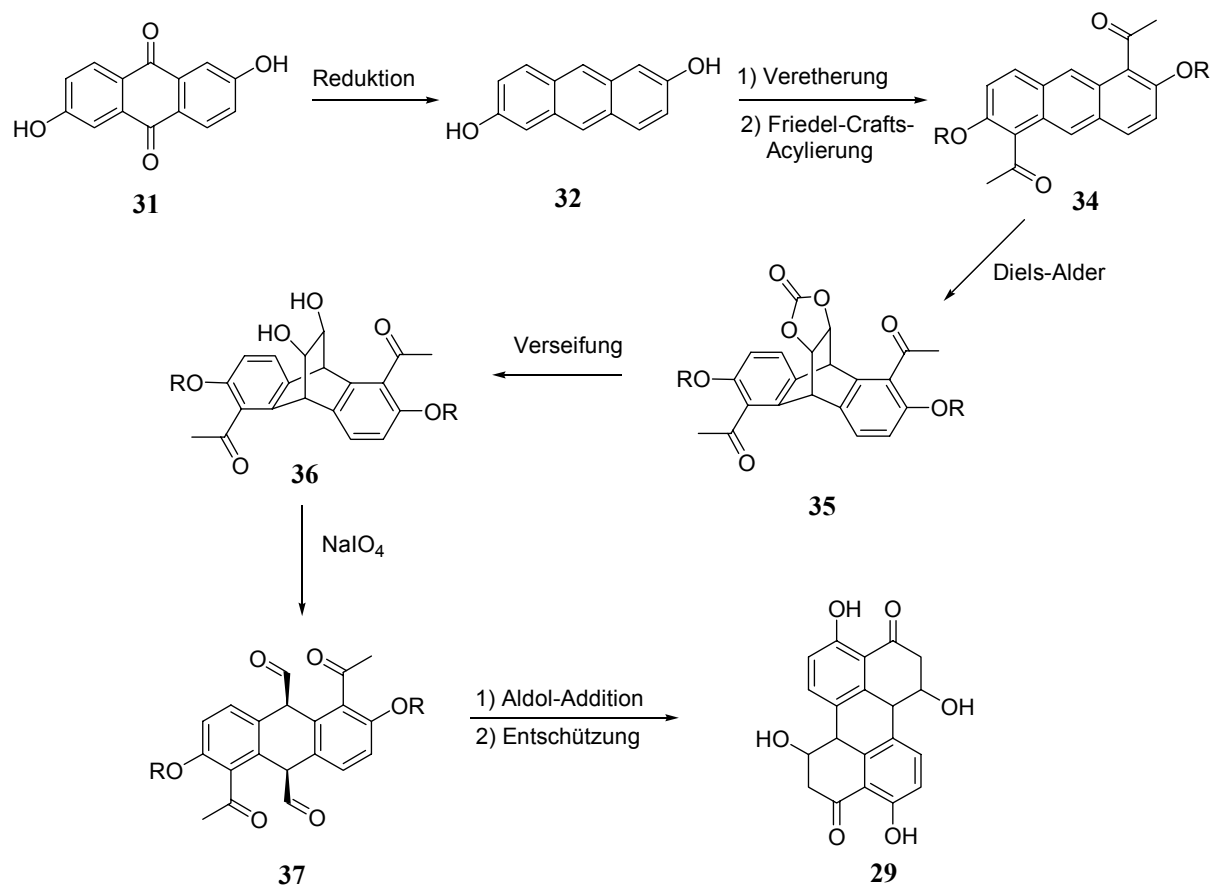


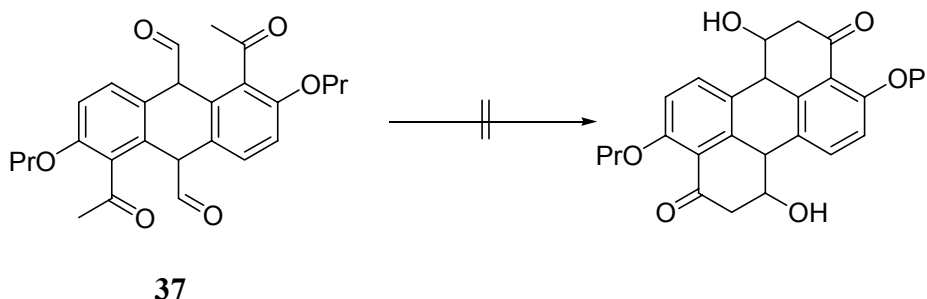
Abb. 64: Synthesepfad zur Darstellung von Stemphyrylenol (11)

### 2.3.1.3. Durchführung

Die Reduktion der Anthraflavonsäure (**31**) gelang in einer wässrigen Natriumcarbonatlösung mit Natriumborhydrid und liefert 2,6-Dihydroxyanthracen (**32**) mit einer sehr guten Ausbeute von 91 %<sup>[71]</sup>. Als Schutzgruppe für die Hydroxygruppen wurde zunächst der Methylether gewählt. Die Löslichkeit des Ethers in Chloroform ist allerdings gering. Es lösten sich weniger als 1 g pro Liter. Als alternative Schutzgruppen kam ein Benzylether oder ein längerkettiger Alkylether in betracht. Bei dem Benzylether wurde angenommen, dass er unter den Bedingungen der Friedel-Crafts-Acylierung nicht stabil ist. Aus diesem Grund wurde **32** mit Brompropan in DMF und Natriumjodid als Katalysator in den Dipropylether (**33**) übergeführt. Die Reaktion wurde mit einer Ausbeute von 65 % durchgeführt. Die regioselective Acylierung zu **34** gelang wie in der Literatur beschrieben in trockenem Chloroform bei 0 °C. Die Diels-Alder-Reaktion zu **35** wurde in Vinylencarbonat (**38**), das als Dienophil fungierte, bei 180 °C durchgeführt<sup>[72]</sup>. Nach sechsständigem Erhitzen wurde die Reaktionslösung abgekühlt und das Vinylencarbonat abdestilliert. Das cyclische Carbonat **35** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel als weißer Feststoff mit einer

guten Ausbeute von 60 % erhalten. Bis zu diesem Reaktionsschritt waren alle Substanzen  $C_2$ -symmetrisch. Durch die Diels-Alder-Reaktion wurde die Symmetrie aufgehoben, was gut an den NMR-Spektren zu erkennen ist. Bei der gaschromatographischen Untersuchung fällt auf, dass der Basispeak um 86 Masseneinheiten kleiner ist als der Peak des Moleküllions, was auf eine Retro-Diels-Alder-Reaktion in der Gasphase zurück zu führen ist. Zur Verseifung des Carbonats **35** wurde es in einer ethanolischen KOH-Lösung bei 60 °C gerührt. Das Diol **36** wurde nach Reinigung über eine kurze Kieselgelsäule in einer Ausbeute von 95 % erhalten. Zur Periodatspaltung wurde **36** in Dioxan gelöst und eine wässrige Lösung von Natriumperiodat zugetropft. Die Reaktion verläuft glatt zum Dialdehyd **37** mit einer Ausbeute von 90 %. Anhand der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren lässt sich zeigen, dass dieser wiederum  $C_2$ -symmetrisch ist, da nur die Hälfte aller Signale zu detektieren ist.

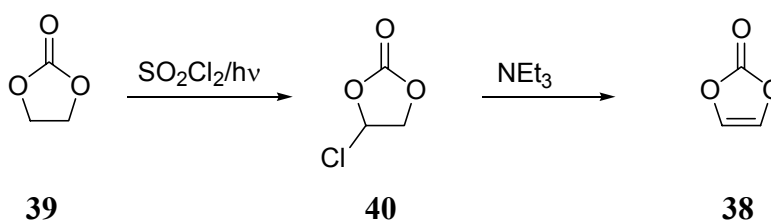
Anschließend wurde versucht, die Aldolreaktion durchzuführen. Diese gelang nicht, obwohl verschiedene Basen bei verschiedenen Temperaturen getestet wurden. Bei zu niedrigen Temperaturen fand keine Reaktion statt. Sobald die Temperatur erhöht wurde, färbte sich die Lösung tiefrot. Trotz mehrmaliger chromatographischer Auftrennung des Reaktionsproduktes gelang es nicht eine einheitliche Substanz zu isolieren.



**Abb. 65:** Versuch zur Darstellung des geschützten Stemphyperlenols

Wahrscheinlich misslang der Ringschluss aufgrund der zu hohen Acidität der Protonen in  $\alpha$ -Stellung zu den Aldehydgruppen.

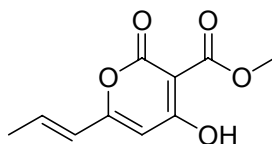
Die Herstellung des Vinylencarbonats (**38**) gelang nach einer Methode von Newman und Addor<sup>[73]</sup>.



**Abb. 66:** Darstellung des Vinylencarbonats (**38**)

Ethylencarbonat (**39**) wurde im ersten Schritt durch eine radikalische Substitution in das Chlorid **40** übergeführt. Diese Reaktion wurde in abs. Tetrachlorkohlenstoff unter UV-Bestrahlung bei ca. 70 °C durchgeführt. Als Produkt wurde ein Gemisch von **39** und **40** erhalten. Laut des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums enthielt das Reaktionsgemisch 65 % des Chlorids **40**. Das Reaktionsgemisch wurde ohne weitere Reinigung in die nächste Stufe eingesetzt. Durch Eliminierung mittels Triethylamin in Diethylether wurde das Vinylencarbonat (**38**) nach Kugelrohrdestillation erhalten.

### 2.3.2. Syntheseversuch zur Darstellung des Pyrancarbonsäureesters



**41**

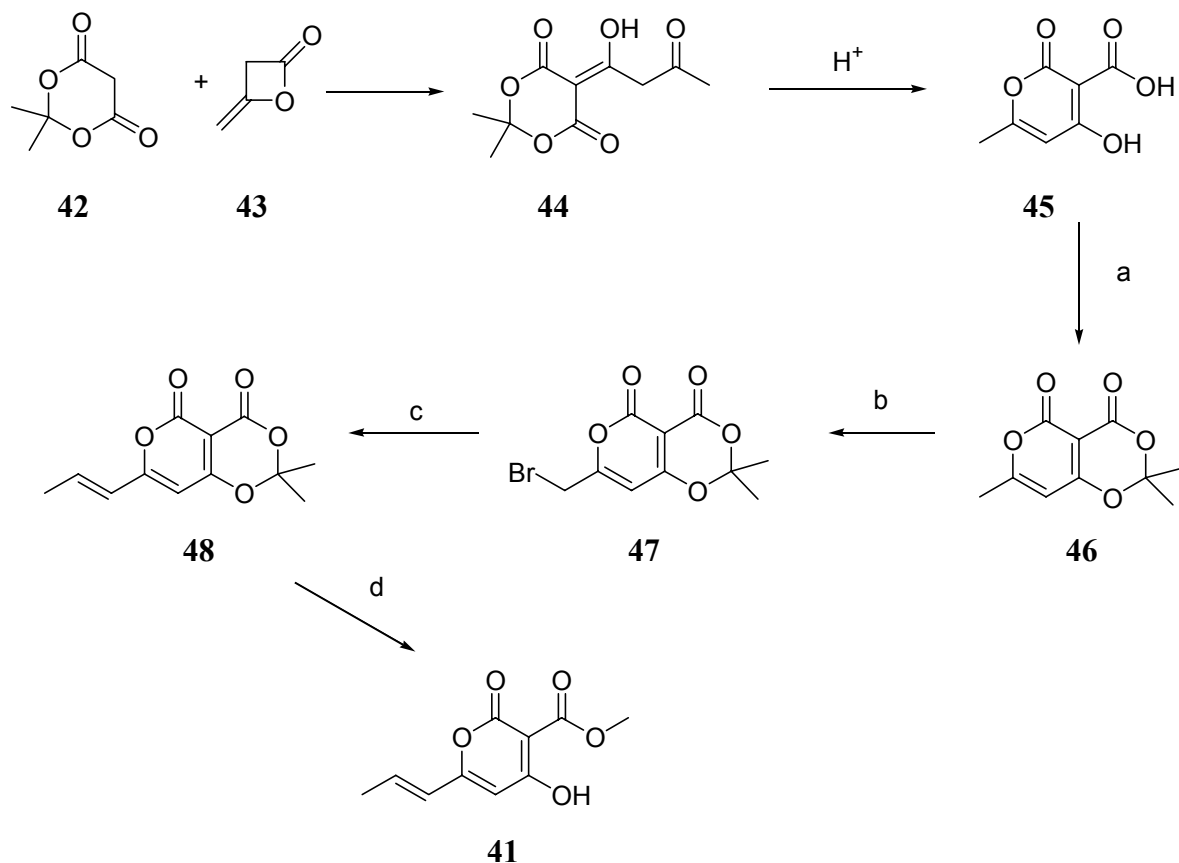
#### 2.3.2.1. Motivation

Der Naturstoff **41** ist ein Pyranderivat. Er wurde von Frau Kliche-Spory als Sekundärmetabolit aus einem endophytischen Pilz isoliert und charakterisiert. Er fiel im Agardiffusionstest durch seine gute fungizide Wirkung auf.

#### 2.3.2.2. Syntheseplanung

In der Literatur ist die Synthese der 4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2*H*-pyran-3-carbonsäure (**45**) aus Meldrumsäure (**42**) und Diketen (**43**) beschrieben<sup>[74]</sup>. Das Pyran **45** hat das gleiche Substitutionsmuster wie der Naturstoff **41**.





**Abb. 67:** Syntheseplan zur Darstellung des Naturstoffs **41**

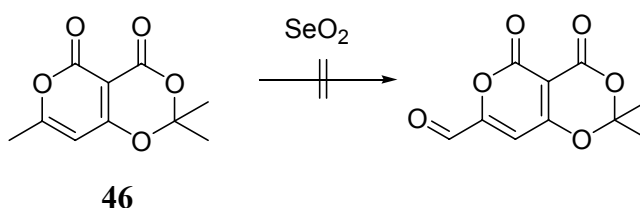
Ziel der Synthese war die Einführung der Propenylseitenkette und die Veresterung der Carbonsäure. Im ersten Schritt soll die Carbonsäure und die Hydroxygruppe von **45** als Acetonid (**46**) geschützt werden (a). Anschließend folgt die Bromierung der Methylgruppe (b) und die Einführung der Propenylseitenkette durch eine Wittig-Reaktion (c). Die Darstellung des Naturstoffs **41** folgt durch saure Abspaltung der Schutzgruppe in Methanol, bei der gleichzeitig der Methyl ester gebildet wird.

### 2.3.2.3. Durchführung

Die Darstellung der Carbonsäure **45** geschah wie in der Literatur beschrieben. Meldrumsäure wurde mit Diketen (**43**) in Gegenwart einer äquimolaren Menge Triethylamin zu **44** umgesetzt. Die Reaktionsmischung wurde mit kalter HCl-Lösung gewaschen, getrocknet und auf die Hälfte des Volumens eingengt. Aus dieser Lösung kristallisierte **44** in 95 %iger Ausbeute aus. Das Hydroxy-3-oxobutylidenderivat **44** wurde ohne weitere Reinigung mit *para*-Toluolsulfonsäure in Chloroform in die Carbonsäure **45** übergeführt. Die Umsetzung zum Acetonid **46** gelang indem **45** in Essigsäureanhydrid gelöst wurde, mit der dreifachen Menge Aceton und 10 mol% *para*-Toluolsulfonsäure versetzt und bei Raumtemperatur für 12

h gerührt wurde. Anschließend wurde die Lösung auf  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und die entstandenen weißen Kristalle abgesaugt. Danach wurde versucht die Methylgruppe radikalisch mit NBS zu bromieren. Dieses gelang trotz verschiedener Versuche nicht.

Aufgrund dieser Tatsache wurde eine Modifikation der Syntheseplanung vorgenommen. Statt der Bromierung wurde versucht die Methylgruppe in einem Aldehyd zu überführen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Methylgruppen ähnlicher Pyronderivate durch Oxidation mit Selendioxid in die entsprechenden Aldehyde übergeführt werden können<sup>[75,76]</sup>. Auch dieser Versuch scheiterte.



**Abb. 68:** Oxidationsversuch von **46** mit  $\text{SeO}_2$

**46** wurde auf seine biologische Aktivität getestet. Er zeigte nur eine sehr geringe Wirkung. Einzig zu dem Hemmhofradius von 0.1 cm bei *Eurotium repens* zeigte er noch zusätzlich eine Wachstumshemmung. Das Testergebnis zeigt, dass für die biologische Aktivität die Hydroxygruppe ungeschützt vorliegen muss.

### **3. Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus Rohextrakten von vier Pilzstämmen und einer Flechtenart beschrieben. Außerdem wurde eine Substanz aus einer Pflanze identifiziert. Die Pilzstämmen 4567 und 4689 sind Endophyten, die Pilzstämmen 3304 und 5451 wurden aus Bodenproben isoliert, die Flechte *Usnea dasypoga* Rohi stammte aus Sumatra, Indonesien.

Aus dem Pilzstamm 4567 konnten insgesamt sechs Naturstoffe isoliert und identifiziert werden, von denen vier der Gruppe der Isocoumarine zugeordnet werden konnten. Der Naturstoff **4567-1** wurde erstmals von Turner und Aldridge<sup>[20]</sup> beschrieben. Die Isocoumarine **4567-2** – **4567-4** sowie das Furanderivat **4567-5** stellen literaturunbekannte Verbindungen dar. Das Butanonderivat **4567-6** ist bisher nur als Syntheseprodukt bekannt<sup>[22]</sup>. Alle aus diesem Pilz isolierten Naturstoffe zeigen eine ungewöhnliche Methylierung am Aromaten, die nicht auf die übliche Polyketid-Biosynthese zurückzuführen ist.

Die biologische Testung ergab, dass die Naturstoffe **4567-3** und **4567-5** eine mäßige antifungische Wirkung besitzen und die anderen Sekundärmetabolite keine Wirkung gegen die getesteten Organismen zeigen. Die Verbindungen, die für die Aktivität des Rohextraktes gegenüber verschiedenen Pilzen verantwortlich sind, konnten bisher nicht isoliert werden.

Aus zwei Fraktionen des Rohextraktes des Pilzstammes 3304, welche von Herrn John durch säulenchromatographische Trennung gewonnen wurden, konnte der Sekundärmetabolit **3304-1** isoliert werden. Hierbei handelt es sich um Strobilurin D, welches 1990 erstmals beschrieben wurde<sup>[27,28]</sup>. Die Strobilurine bilden zusammen mit den Oudemansinen die Gruppe der antifungischen  $\beta$ -Methoxyacrylat-Antibiotika. Strobilurin A (**5**) und Oudemansin A (**7**) stellen Leitstrukturen dar, von denen die Entwicklung verschiedener Fungizide ausging.

Die biologische Aktivität des Rohextraktes kann neben anderen Substanzen auch auf das Strobilurin D (**3304-1**) zurückgeführt werden.

Aus dem Rohextrakt der Kultur des Endophyten 4689 konnte Lateropyron (**4689-1**) isoliert werden. Das Benzopyrandionderivat wurde 1984 als Sekundärmetabolit des Pilzes *Fusarium lateritium* Nees beschrieben<sup>[30]</sup>. Testungen durch die Autoren ergaben, dass das Chromen **4689-1** wachstumshemmend auf *Staphylococcus aureus* wirkt. Diese grampositiven Bakterien sind Erreger von abszedierenden Entzündungen sowie von Herzentzündungen und Sepsis. Durch die Fähigkeit zur relativ raschen Bildung von Antibiotikaresistenzen gehört *Staphylococcus aureus* zu den bedeutenden Erregern von Krankenhausinfektionen<sup>[1]</sup>.

Aus dem Rohextrakt des Pilzes *Aphanocladium spectabile* (Pilzstamm 5451) konnten die vier Naturstoffe **5451-1** – **5451-4** isoliert werden. Diese Verbindungen sind Sesquiterpene, die der Naturstoffklasse der Trichothecene zuzuordnen sind. Bei der Verbindung **5451-1** handelt es sich um Verrucain L-Acetat, welches 1981 aus dem Pilz *Myrothecium verrucaria* neben Verrucain L isoliert und beschrieben wurde<sup>[32]</sup>. Zudem konnten 300 mg Trichodermol **5451-2** isoliert werden. Die Testung der biologischen Aktivität dieser beiden Verbindungen zeigte, dass sie eine hervorragende fungizide Wirkung besitzen. Die Strukturaufklärung von **5451-3** führte zum Verrol. Verrol wurde 1983 auch aus dem Extrakt von *Myrothecium verrucaria* gewonnen<sup>[34]</sup>. Die Substanz **5451-4** ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Der Unterschied zum Verrol ist die Substitution eines Wasserstoffatoms am Kohlenstoffatom C-8 durch eine Acetoxygruppe. Verrucain L-Acetat **5451-1** ist ebenfalls am Kohlenstoffatom C-8 oxygeniert, so dass **5451-4** biochemisch als Zwischenstufe zur Synthese von **5451-1** aufgefasst werden kann.

Die Naturstoffe **5451-3** und **5451-4** konnten aufgrund ihrer geringen Menge nicht getestet werden. Da dieser Pilz diese interessanten Sekundärmetabolite produziert und im Flüssigmedium wächst, scheint die nochmalige Anzucht in einem größeren Maßstab sinnvoll. Es muss bei der Aufarbeitung und Isolierung aber besonders vorsichtig vorgegangen werden, da es sich beim Verrucain L-Acetat (**5451-1**) um ein Kontaktgift handelt, welches zu Hautreizungen und Augenbindehaut-Entzündungen führen kann.

Die Isolierung der (+)-*R*-Usninsäure (**P-1**) gelang aus dem Rohextrakt der Flechte *Usnea dasypoga* Rohi.

Der Naturstoff **P-2** wurde uns von Herrn Dr. M. S. Rao zur Strukturaufklärung überlassen. Er konnte ihn aus der Pflanze *Crotalaria Prostrata* isolieren. Die Identifizierung der Substanz **P-2** ergab, dass es sich um 1-(2'-Hydroxyphenyl)-3-(3'',4'',5''-trimethoxyphenyl)-2-propen-1-on einem Chalcon handelt. Dieses ist in der Literatur bisher nur als Syntheseprodukt beschrieben<sup>[45]</sup>.

Die absoluten Konfigurationen von elf verschiedenen Naturstoffen konnten mittels quantenchemischer Berechnung der CD-Spektren und anschließendem Vergleich mit den gemessenen CD-Spektren aufgeklärt werden. Diese Methode wurde bei den Preussomerinen G – L, den Xyloketalen A und D und den Palmarumycinen C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub> und C<sub>12</sub> angewendet. Hierdurch wurde die Einsetzbarkeit dieses Verfahrens für unterschiedliche Naturstoffklassen belegt. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist, dass praktisch kein Substanzverlust auftritt. An-

zumerken ist, dass wegen der Limitierung bei der Berechnung der CD-Spektren bisher nur Verbindungen, die aus Elementen der 1. Periode bestehen, für dieses Verfahren geeignet sind.

Im synthetischen Teil wurden die ersten Schritte zur Darstellung des Stemphyperlylenols (**29**) und ein Syntheseversuch zur Darstellung von 4-Hydroxy-2-oxo-6-propenyl-2*H*-pyran-3-carbonsäuremethylester (**41**) vorgestellt.

Der Sekundärmetabolit **29** fiel durch seine starke herbizide Wirkung auf und ist bisher nicht synthetisch hergestellt worden. Als Ausgangsverbindung für die Synthese diente Anthraflavonsäure (**31**), die durch Reduktion mit Natriumborhydrid und anschließender Veretherung mit 1-Brompropan in den Diether **33** übergeführt wurde. Mittels einer regioselektiven Friedel-Crafts-Acylierung wurde das Anthracenderivat **34** erhalten. Die Diels-Alder-Reaktion mit Vinylencarbonat (**38**) führte zum cyclischen Carbonat **35**. Die Verseifung des Carbonats gelang nahezu quantitativ in einer alkalischen Ethanollösung. Das so erhaltene Diol (**36**) wurde mit Natriumperodat in den Dialdehyd **37** übergeführt. Der geplante Ringschluss durch eine Aldolreaktion konnte aber trotz Variation der Bedingungen nicht realisiert werden.

Wahrscheinlich misslang der Ringschluss aufgrund der zu hohen Acidität der Protonen in  $\alpha$ -Stellung zu den Aldehydgruppen. Die Herstellung von Stemphyperlylenol (**29**) sollte durch eine geringe Modifikation des Syntheseweges möglich sein.

Als Ausgangsverbindungen zur Herstellung von 4-Hydroxy-2-oxo-6-propenyl-2*H*-pyran-3-carbonsäuremethylester (**41**) diente die Carbonsäure **45**. Die Darstellung erfolgte wie in der Literatur beschrieben<sup>[74]</sup>. Der Syntheseplan sah eine Schützung der Carboxyl- und Hydroxygruppe vor, der dann eine radikalische Bromierung der Methylgruppe folgen sollte. Durch Reaktion mit Aceton wurde **45** in das Acetonid **46** übergeführt. Aber alle Versuche, diese Verbindung zu bromieren, scheiterten. Auch eine Oxidation der Methylgruppe mit Selen-dioxid misslang. Während der Reaktion zersetzte sich das Acetonid **46**.

Es zeigte sich, dass eine Synthese des Naturstoffs **41** auf diesem Weg offenbar nicht möglich ist.

## **4. Experimenteller Teil**

### **4.1. Allgemein verwendete Analyse- und Meßmethoden**

#### Analytische Dünnschichtchromatographie (DC):

Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel-Fertigfolien (Kieselgel 60, F254) der Fa. E. Merck AG, Darmstadt durchgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit UV-Licht (Löschung der Fluoreszenz des Indikators bei 254 nm oder Anregung der Eigenfluoreszenz durch UV-Licht der Wellenlänge 366 nm). Zur zusätzlichen Detektion einzelner Substanzen wurden folgende Sprühreagenzien verwandt:

#### Schwefelsäure-Reagenz (Universalreagenz):

Eine 8 %ige ethanolische Schwefelsäurelösung diente als Sprühreagenz. Die DC-Folie wird anschließend so lange mit der Heizpistole erwärmt, bis die Substanz sichtbar wird.

#### Cer(IV)/Molybdätophosphorsäure-Reagenz (Universalreagenz):

Als Sprühhlösung verwendet man eine Lösung von 10 g Cer-(IV)-sulfat, 25 g Molybdätophosphorsäure und 60 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in 960 mL Wasser. Beim Erhitzen mit der Heizpistole entstehen durch Reaktion mit organischer Substanz tiefblaue Mischoxide des vier- bis sechswertigen Molybdäns.

#### 2,4-Dinitrophenylhydrazin für Aldehyde und Ketone:

Die Lösung wird durch Versetzen von 1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 1 L Ethanol mit 5 mL konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  hergestellt. Beim Erwärmen bilden Aldehyde und Ketone gelbe bis orange-farbende Flecken.

#### Bromkresolgrün für Säuren:

Eine 0.04 %ige Lösung von Bromkresolgrün in Isopropanol, die mit 2 mol/L Natronlauge auf pH 7 eingestellt wird, dient als Sprühhlösung. Säuren bilden sofort gelbe bis gelb-grüne Flecken.

#### Säulenchromatographie:

Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (230–400 mesh, 0.040–0.063 mm) der Fa. Merck AG, Darmstadt.

Präparative Schichtchromatographie (PSC):

Für die präparative Schichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 und RP-18 beschichtete Fertigplatten der Fa. Macherey und Nagel verwendet. Die Schichtdicken wurden nach Trennproblem und Substanzmenge gewählt.

Reinigung von Lösemitteln:

Die Reinigung der Lösungsmittel erfolgte nach Standardmethoden<sup>[78,79]</sup>.

Schmelzpunktbestimmung:

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren mit einer Schmelzpunktbestimmungssap- paratur der Fa. Gallenkamp gemessen und wurden nicht korrigiert.

Massenspektrometrie:

Die Aufnahme der Massenspektren und die Bestimmung der Feinmassen wurden von Herrn Dr. Dülcks an einem Finnigan MAT 8200 in der Universität Bremen und an einem Fison MD 800 von Herrn Jonk vorgenommen. Den beiden genannten Personen sei an dieser Stelle herzlich gedankt. Die relativen Intensitäten, bezogen auf den Basispeak, sind hinter den Massen in Klammern angegeben.

Röntgenstrukturanalyse:

Die Röntgenstrukturanalysen wurden von Herrn Dr. U. Flörke durchgeführt, dem ich hiermit herzlich danke.

UV/VIS-Spektroskopie:

Zur Aufnahme der UV/VIS-Spektren wurde das Spektrometer UV-2101 PC der Fa. Shimadzu verwendet.

Infrarotspektroskopie:

Die IR-Spektren der untersuchten Substanzen wurden mit dem FTIR-Gerät 510 p der Fa. Nicolet aufgenommen. Die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit Hilfe des PCIR-Program- mes derselben Firma. Die Angabe der Probenmatrix erfolgt in Klammern.

Optische Rotation:

Die Drehwerte wurden in den angegebenen Lösungsmitteln und Konzentrationen mit dem Polarimeter 241 der Fa. Perkin-Elmer in einer unthermostatisierten Standardküvette (d = 10 cm) unter Verwendung einer Natriumlampe (D-Linie,  $\lambda = 589 \text{ nm}$ ) bestimmt.

CD-Spektroskopie:

Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco J-715/150S Spektrometer bei 25 °C aufgenommen. Die Temperaturkontrolle geschah mittels eines Peltier Thermostats. Die Spektren wurden von Herrn Dr. F. Zsila in Budapest und Herrn Prof. Dr. S. Antus in Debrecen gemessen, wofür ich mich herzlich bedanke.

Programm zur Berechnung der CD-Spektren:

BDZDO/MCDSPD-Programmpaket von J. W. Downing, Department of Chemistry and Biochemistry, University of Colorado, Boulder, USA; modifiziert von J. Fleischhauer, W. Schleker und B. Kramer. Für die Bereitstellung des Programmes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Fleischhauer herzlich bedanken.

Programm zur Berechnung der Konformere:

Spartan SGI Version 5.1.3; Wavefunction Inc., Irvine, USA.

NMR-Spektroskopie:

Die Kernresonanzspektren wurden an einem Bruker ARX 200, AMX 300 bzw. ARX400-Spektrometer aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  wurden auf das jeweils verwandte deuterierte Lösemittel als inneren Standard bezogen und sind in ppm angegeben. Die Abkürzungen der Multiplizitäten lauten:

(s)	Singulett	bzw. quartäres Kohlenstoffatom
(d)	Dublett	bzw. tertiäres Kohlenstoffatom
(t)	Triplett	bzw. sekundäres Kohlenstoffatom
(q)	Quartett	bzw. primäres Kohlenstoffatom
(m)	Multiplett	
(pt)	Pseudo Triplett	

Für die Aufnahme der NMR-Spektren am ARX 400-Spektrometer der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH in Braunschweig bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Dr. Wray.

## 4.2. Mikrobiologische Arbeitsmethoden

Die Auswahl, Anzucht, Pilzbestimmung, Extraktion und die Durchführung der Aktivitätstests wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Aust, Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig durchgeführt. Für die geleistete Arbeit und die gute Kooperation möchte ich an dieser Stelle Frau Dr. B. Schulz, Frau Qunxiu Hu und Herrn Dr. S. Dräger meinen besonderen Dank aussprechen.



#### **4.2.1. Anreicherung der Pilze in Submerskultur**

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Pilze wurden entweder auf Biomalz- oder Malz-Soja-Weichagar-Nährmedien kultiviert. Hierzu wurden 200 oder 250 mL des Mediums in Fernbachkolben gefüllt. Nach der Sterilisation im Autoklaven (121 °C, 2 bar) wurden die entsprechenden Pilze von einer Schrägagarkultur überimpft und stehend bei Raumtemperatur inkubiert.

### **4.3. Experimenteller Teil zur Naturstoffisolierung**

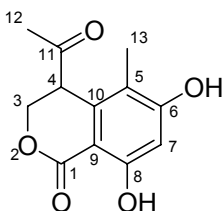
#### **4.3.1. Substanzcharakteristika der Naturstoffe aus dem Pilzstamm 4567**

##### 4.3.1.1. Isolierung

Der Pilz 4567 wurde in je 12 Fernbachkolben auf Malz-Soja-Weichagar und Biomalzagar 130 Tage bei Raumtemperatur kultiviert. Die Kulturen wurden dann mit Eiswasser (2 L) verdünnt und in einem Waring-Blender homogenisiert. Die so erhaltene Homogenisat wurde einmal mit Petrolether (200 mL) ausgeschüttelt und anschließend dreimal mit Ethylacetat (1 L) extrahiert. Anschließend wurden die organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum eingeeengt. DC-Untersuchungen der vier verschiedenen Extrakte zeigten keine signifikanten Unterschiede, so dass sie vereinigt wurden. Der Rohextrakt (4.1 g) wurde anschließend säulenchromatographisch in drei Fraktionen aufgetrennt. Zur Elution diente eine Gradient von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (9 : 1). Aus der polarsten Fraktion wurden mittels präparativer Schichtchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1) die Substanzen **4567-1** (20 mg) und **4567-2** (1.5 mg) isoliert.

Die zweite Fermentation wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Der Rohextrakt (4.0 g) wurde mittels Säulenchromatographie vorgetrennt. Als Elutionsmittel diente ein Gradient von 100 % Petrolether bis 100 % Ethylacetat. Aus der Fraktion mittlere Polarität wurde **4567-3** (15 mg) isoliert, aus der polarsten Fraktion die Naturstoffe **4567-1** (150 mg), **4567-4** (10 mg), **4567-5** (12 mg) und **4567-6** (9 mg).

4.3.1.2. 4-Acetyl-3,4-dihydro-6,8-dihydroxy-5-methylisocoumarin (**4567-1**)



Summenformel: C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>.–

Molmasse: 236.22 g/mol.–

Schmelzpunkt: 204 °C.–

Kristallsystem: triklin.–

Raumgruppe: P<sub>-1</sub>

Dimensionen der Zelle:      a = 7.0347 (13) Å                      α = 89.97(1) °  
    b = 10.2167(14) Å                      β = 87.68(2) °  
    c = 15.1821(14) Å                      γ = 89.74(2) °.–

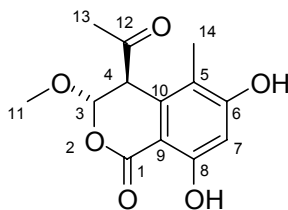
R<sub>f</sub>-Wert: 0.36 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10 %).–

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3307 cm<sup>-1</sup>, 2968, 2931, 1697, 1662, 1625, 1496, 1396, 1268, 1159.–

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 2.07 (s, 3H, 13-H), 2.27 (s, 3H, 12-H), 4.18 (dd, J<sub>4,3a</sub> = 1.3 Hz, J<sub>4,3b</sub> = 3.8 Hz, 1H, 4-H), 4.60 (dd, J<sub>3b,4</sub> = 3.8 Hz, J<sub>3b,3a</sub> = 11.7 Hz, 1H, 3b-H), 4.97 (dd, J<sub>3a,4</sub> = 1.3 Hz, J<sub>3a,3b</sub> = 11.7 Hz, 1H, 3a-H), 6.38 (s, 1H, 7-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 10.0 (q, C-13), 27.7 (q, C-12), 48.7 (d, C-4), 68.7 (t, C-3), 100.4 (s, C-9), 101.5 (d, C-7), 115.4 (s, C-5), 137.7 (s, C-10), 162.9 (s, C-8), 163.9 (s, C-6), 170.1 (s, C-1), 205.7 (s, C-11).–

**4.3.1.3. 4-Acetyl-3,4-dihydro-6,8-dihydroxy-3-methoxy-5-methylisocoumarin  
(4567-2)**



Summenformel: C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>.–

Molmasse: 266.25 g/mol.–

Schmelzpunkt: 207 °C.–

Kristallsystem: monoklin.–

Raumgruppe: P2<sub>1</sub>/c

Zelldimensionen:        a = 12.720(2) Å  
                              b = 7.324(2) Å                        β = 111.18(2) °  
                              c = 13.868(3) Å.–

R<sub>f</sub>-Wert: 0.42 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10 %).–

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3356 cm<sup>-1</sup>, 2942, 1707, 1665, 1262, 1159.–

UV (MeOH): λ<sub>max</sub> (lg ε) = 276 nm (3.45), 313 (3.40).–

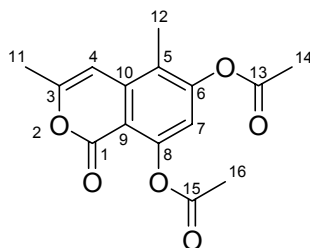
<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 1.96 (s, 3H, 14-H), 2.11 (s, 3H, 13-H), 3.46 (s, 3H, 11-H), 4.24 (d, J<sub>4,3</sub> = 1.3 Hz, 1H, 4-H), 5.65 (d, J<sub>3,4</sub> = 1.3 Hz, 1H, 3-H), 6.26 (s, 1H, 7-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 10.1 (q, C-14), 28.1 (q, C-13), 53.8 (d, C-4), 56.1 (q, C-11), 100.0 (s, C-9), 101.2 (d, C-7), 102.2 (d, C-3), 116.4 (s, C-5), 135.1 (s, C-10), 162.7 (s, C-8), 164.1 (s, C-6), 168.3 (s, C-1), 203.5 (s, C-12).–

EIMS (70 eV, 200 °C): m/z (%) = 266 [M<sup>+</sup>] (45), 206 (100), 192 (53), 164 (30), 43 (42).–

HREIMS: ber.: 266.0790  
gef.:  $266.079 \pm 0.001$ .–

4.3.1.4. 6,8-Diacetoxy-3,5-dimethylisocoumarin (**4567-3**)



Summenformel:  $C_{15}H_{14}O_6$ .–

Molmasse: 290.08 g/mol.–

Schmelzpunkt: 145 °C.–

$R_f$ -Wert: 0.23 ( $CH_2Cl_2$ ).–

UV (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 270 nm (3.38) 329 (2.94).–

IR (Film):  $\tilde{\nu}$  = 2924  $cm^{-1}$ , 2856, 1774, 1735, 1606, 1369, 1190.–

$^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 2.24 (s, 3H, 12-H), 2.31 (s, 3H, 11-H), 2.40 (s, 3H, 14-H), 2.43 (s, 3H, 16-H), 6.40 (s, 1H, 4-H), 6.89 (s, 1H, 7-H).–

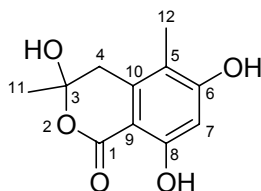
$^{13}C$ -NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 11.7 (q, C-12), 19.9 (q, C-11), 20.8 (q, C-14\*), 21.1 (q, C-16\*), 100.2 (d, C-4), 110.8 (s, C-10), 116.4 (d, C-7), 122.2 (s, C-5), 139.9 (s, C-9), 150.7 (s, C-8), 153.7 (s, C-6), 155.6 (s, C-3), 159.1 (s, C-1), 168.1 (s, C-13\*\*), 169.5 (s, C-15\*\*).–

Signale die mit \* und die mit \*\* gekennzeichnet sind, sind austauschbar!

EIMS (70 eV, 200 °C):  $m/z$  (%) = 290 [ $M^+$ ](8), 248(32), 206 (100), 177(14), 163(6), 135(9), 77(7), 69(6), 43(96).–

HREIMS: ber.: 290.0790  
gef.: 290.078 ± 0.001.–

4.3.1.5. 3,4-Dihydro-3,6,8-trihydroxy-3,5-dimethylisocoumarin (**4567-4**)



Summenformel: C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>.–

Molmasse: 224.21 g/mol.–

Schmelzpunkt: 145 °C.–

Kristallsystem: monoklin.–

Raumgruppe: P2<sub>1</sub>/c.–

Zelldimensionen: a = 7.0455(12) Å  
b = 10.039(5) Å β = 93.918°  
c = 13.902(3) Å.–

R<sub>f</sub>-Wert: 0.28 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10 %).–

UV (MeOH): λ<sub>max</sub> (lg ε) = 274 (3.96), 311 (3.7).–

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3307 cm<sup>-1</sup>, 3199, 2960, 2925, 2854, 1633, 1494, 1267, 1166, 1060.–

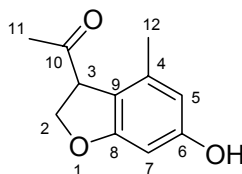
<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 1.70 (s, 3H, 11-H), 2.07 (s, 3H, 12-H), 3.00 (d, J<sub>4a,4b</sub> = 16 Hz, 1H, 4a-H), 3.18 (d, J<sub>4b,4a</sub> = 16 Hz, 1H, 4b-H), 6.28 (s, 1H, 7-H).–

$^{13}\text{C}$ -NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 9.5$  (q, C-12), 27.0 (q, C-11), 36.3 (t, C-4), 100.0 (s, C-3), 100.3 (d, C-7), 102.7 (s, C-9), 114.9 (s, C-5), 137.9 (s, C-10), 162.5 (s, C-8), 163.4 (s, C-6), 170.7 (s, C-1).–

EIMS (70 eV, 200 °C):  $m/z$  (%) = 224 [ $\text{M}^+$ ] (41), 206 (30), 180 (10), 164 (100), 136 (31), 77 (8), 69 (11), 43 (57), 28 (27), 18 (77).–

HREIMS: ber.: 224.06847  
gef.: 224.0689  $\pm$  0.0005.–

#### 4.3.1.6. 3-Acetyl-6-hydroxy-4-methyl-2,3-dihydrobenzofuran(4567-5)



Summenformel:  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$ .–

Molmasse: 192.21 g/mol.–

Schmelzpunkt: der Naturstoff ist als schwach gelbes Öl isoliert worden.–

$R_f$ -Wert: 0.23 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  10 %).–

UV (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 289 nm (3.52).–

IR (Film):  $\tilde{\nu} = 3369$   $\text{cm}^{-1}$ , 2956, 2929, 2875, 1710, 1614, 1596, 1463, 1456, 1143.–

$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 2.09$  (s, 3H, 11-H), 2.23 (s, 3H, 12-H), 3.56 (dd,  $J_{3,2a} = 4.1$  Hz,  $J_{3,2b} = 10.2$  Hz, 1H, 3-H), 4.13 (dd,  $J_{2a,3} = 10.2$  Hz,  $J_{2a,2b} = 8.7$  Hz, 1H, 2a-H), 4.20 (dd,

## Experimenteller Teil

---

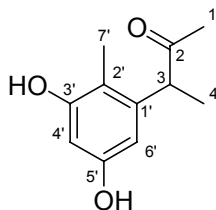
$J_{2b,3} = 4.1$  Hz,  $J_{2b,2a} = 8.7$  Hz, 1H, 2b-H), 6.02 (d,  $J_{7,5} = 2.4$  Hz, 1H, 7-H), 6.27 (d,  $J_{5,7} = 2.4$  Hz, 1H, 5-H).–

$^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta = 10.6$  (q, C-12), 29.1 (q, C-11), 57.7 (d, C-3), 62.9 (t, C-2), 101.7 (d, C-5), 106.2 (d, C-7), 115.1 (s, C-9), 137.4 (s, C-4), 155.8 (s, C-8), 156.5 (s, C-6), 209.3 (s, C-10).–

EIMS (70 eV, 200 °C):  $m/z$  (%) = 192 [ $\text{M}^+$ ] (20), 161 (8), 149(16), 137 (24), 123(10), 107 (8), 91 (10), 77 (14), 69(19), 43 (100).–

HREIMS: ber.: 192.07864  
gef.: 192.0791  $\pm$  0.0005

### 4.3.1.7. 3-(3',5'-Dihydroxy-2'-methylphenyl)-2-butanon (**4567-6**)



Summenformel:  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$ .–

Molmasse: 194.23 g/mol.–

Schmelzpunkt: die Substanz wurde als hellgelbes Öl isoliert.

$R_f$ -Wert: 0.35 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  2 %).–

UV (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  (lg  $\epsilon$ ) = 287 nm (2.68).–

IR (Film):  $\tilde{\nu} = 3373$   $\text{cm}^{-1}$ , 2978, 2933, 2871, 1699, 1614, 1597, 1461, 1456, 1278, 1142.–

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.22 (d,  $J_{4,3}$  = 6.9 Hz, 3H, 4-H), 1.98 (s, 3H, 1-H), 2.12 (s, 3H, 7'-H), 3.89 (q,  $J_{3,4}$  = 6.9 Hz, 1H, 3-H), 5.93 (br s, 1H, OH), 6.08 (d,  $J_{4',6'}$  = 2.4 Hz, 1H, 4'-H), 6.22 (d,  $J_{6',4'}$  = 2.4 Hz, 1H, 6'-H).–

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 11.2 (q, C-7'), 17.0 (q, C-4), 29.1 (q, C-1), 50.1 (d, C-3), 102.2 (d, C-6'), 106.5 (d, C-4'), 114.8 (s, C-2'), 141.6 (s, C-1'), 155.1 (s, C-3'), 155.8 (s, C-5'), 211.5 (s, C-2).–

EIMS (70 eV, 200 °C):  $m/z$  (%) = 194 [ $\text{M}^+$ ] (28), 152 (15), 151 (100), 123 (19), 43 (45).–

HREIMS: ber.: 194.0943  
gef.: 194.0941

### 4.3.2. Substanzcharakteristika des Naturstoffs aus dem Pilzstamm 3304

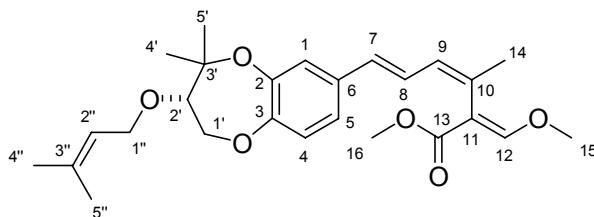
#### 4.3.2.1. Isolierung

Der Pilzstamm 3304 wurde 89 Tage bei Raumtemperatur auf den Nährmedien Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar (insgesamt 6 L) kultiviert. Die Kulturen wurden dann mit Eiswasser verdünnt und in einem Waring-Blender homogenisiert. Anschließend wurden die Pilzkulturen homogenisiert und einmal mit Petrolether und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Extrakte wurden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und die Lösemittel im Vakuum abdestilliert.

Herr John trennte die Rohextrakte mittels Säulenchromatographie in zwölf Fraktionen. Die Fraktionen 3 und 4 wurden dann von mir weiter bearbeitet. Der dünnschichtchromatographische Vergleich zeigte, dass die beiden Fraktionen sich ähnelten und wurden daher vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : PE (95 : 5) aufgetrennt. Es wurde **3304-1** als gelbes Öl erhalten (15 mg).



4.3.2.2. Strobilurin D (3304-1)



Summenformel: C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>.–

Molmasse: 442.54 g/mol.–

Schmelzpunkt: die Substanz wurde als gelbes Öl isoliert.–

R<sub>f</sub>: 0.4 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 99 : 1).–

Drehwert:  $[\alpha]_D^{20} = +20^\circ$  (c = 0.5, EtOH).–

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 298 (4.04), 289 (4.04).–

IR (Film):  $\tilde{\nu} = 2981 \text{ cm}^{-1}$ , 2924, 1734, 1506, 1439, 1269, 1144.–

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta = 1.23$  (s, 3H, 4'-H), 1.48 (s, 3H, 5''-H), 1.70 (s, 3H, 5''-H), 1.81 (s, 3H, 4''-H), 1.95 (s, 3H, 14-H), 3.53 (dd,  $J_{2,1'} = 3.3 \text{ Hz}$ ,  $J_{2,1''} = 7.7 \text{ Hz}$ , 1H, 2'-H), 3.77 (s, 3H, 16-H), 3.87 (s, 3H, 15-H), 3.98 (m, 1H, 1'-H), 4.10 (m, 1H, 1''-H), 4.15 (m, 1H, 1''-H), 4.26 (m, 1H, 1'-H), 5.36 (m, 1H 2''-H), 6.24 (dd,  $J_{9,14} = 1.3 \text{ Hz}$ ,  $J_{9,8} = 10.0 \text{ Hz}$ , 1H, 9-H), 6.38 (d,  $J_{7,8} = 15.3 \text{ Hz}$ , 1H, 7-H), 6.52 (dd,  $J_{8,9} = 10.0 \text{ Hz}$ ,  $J_{8,7} = 15.3 \text{ Hz}$ , 1H, 8-H), 6.86 (d,  $J_{4,5} = 8.8 \text{ Hz}$ , 1H, 4-H), 6.95 (d,  $J_{1,5} = 2.0 \text{ Hz}$ , 1H, 1-H), 6.99 (dd,  $J_{5,4} = 8.8 \text{ Hz}$ ,  $J_{5,1} = 2.0 \text{ Hz}$ , 1H, 5-H), 7.51 (s, 1H, 12-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta = 18.5$  (q, C-5''), 21.2 (q, C-4'), 24.1 (q, C-14), 26.2 (q, C-4''), 28.1 (q, C-5'), 52.0 (q, C-16), 62.4 (q, C-15), 67.8 (t, C-1''), 69.1 (t, C-1'), 81.0 (s, C-3'), 82.4 (d, C-2'), 111.2 (s, C-11), 121.0 (d, C-4), 121.3 (d, C-2''), 122.0 (d, C-5), 122.8 (d,

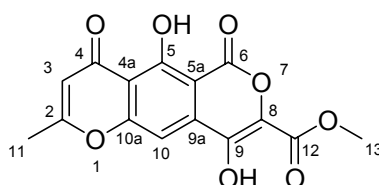
C-1), 126.1 (d, C-8), 130.2 (d, C-9), 130.8 (d, C-7), 131.2 (s, C-10), 134.1 (s, C-6), 137.8 (s, C-3''), 147.2 (s, C-2), 151.2 (s, C-3), 159.2 (d, C-12), 168.4 (s, C-13).–

### 4.3.3. Substanzcharakteristika des Naturstoffs aus dem Pilzstamm 4689

#### 4.3.3.1. Isolierung

Der Pilzstamm 5451 wurde 37 - 46 Tage bei Raumtemperatur auf den Nährmedien Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar (insgesamt 6 L) kultiviert. Die Kulturen wurden dann mit Eiswasser verdünnt und in einem Waring-Blender homogenisiert. Anschließend wurden die Pilzkulturen homogenisiert und einmal mit Petrolether und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die Extrakte wurden über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und die Lösemittel im Vakuum abdestilliert. Die vier Extrakte wurden nach DC-Vergleichen vereinigt, der so erhaltene Rohextrakt (3.1 g) wurde mittels Säulenchromatographie in drei Fraktionen getrennt. Als Elutionsmittel diente Dichlormethan, dem bis zu 10 % Methanol zugefügt wurde. Aus der Fraktion mittlerer Polarität konnte der Naturstoff **4689-1** (120 mg) durch Kristallisation aus Dichlormethan/Aceton (9 : 1) gewonnen werden.

#### 4.3.3.2. Lateropyron (**4689-1**)



Summenformel: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub>.–

Molmasse: 318.24 g/mol.–

Schmelzpunkt: 293 °C.–

$R_f = 0.45$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 97 : 3$ ).–

UV ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\lg \epsilon$ ) = 363 nm (4.16), 347 (4.15), 278 (4.24).–

IR (Film):  $\tilde{\nu} = 3088 \text{ cm}^{-1}$ , 2924, 1749, 1653, 1610, 1248.–

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta = 2.48$  (d,  $J_{11,3} = 0.6 \text{ Hz}$ , 3-H, 11-H), 4.04 (s, 3H, 13-H), 6.28 (d,  $J_{3,11} = 0.6 \text{ Hz}$ , 1H, 3-H), 7.47 (s, 1H, 10-H), 10.42 (s, 1H, OH), 14.70 (s, 1H, OH).–

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, DMSO):  $\delta = 2.41$  (s, 3H, 11-H), 4.02 (s, 3H, 13-H), 6.47 (s, 1H, 3-H), 7.39 (s, 1H, 10-H).–

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta = 21.2$  (q, C-11), 53.8 (q, C-13), 102 (d, C-10), 110.8 (d, C-3), 138.5 (s), 146.4 (s), 160.7 (s), 166.7 (s), 167.0 (s), 169 (s, C-2), 183.6 (s, C-4).–

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz, DMSO):  $\delta = 24.9$  (q, C-11), 57.7 (q, C-13), 105.9 (d, C-10), 110.1 (d, C-3), 114.7 (s, C-5a), 115.6 (s, C-4a), 131.4 (s, C-9a), 143.1 (s, C-5)\*\* , 148.4 (s, C-9)\*\* , 159.3 (s, C-8)\*\* , 164.6 (s, C-10a)\*\* , 168.6 (s, C-6)\* , 170.3 (s, C-2), 174.7 (s, C-12)\* 187.2 (s, C-4).–

Signale mit \* und mit \*\* können nicht eindeutig zugeordnet werden.

EIMS (70 eV, 200 °C)  $m/z$  (%): 318 [ $\text{M}^+$ ] (28), 230 (22), 202 (100), 174 (32), 134 (14), 107 (8), 79 (4), 28 (28).–

HREIMS: ber.: 318.0376

gef.: 318.0369

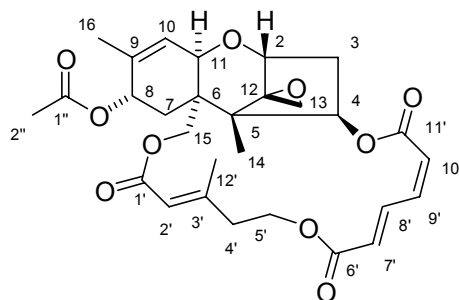
#### **4.3.4. Substanzcharakteristika der Naturstoffe aus dem Pilzstamm 5451**

##### 4.3.4.1. Isolierung

Der Pilzstamm 5451 wurde 110 Tage bei Raumtemperatur auf den Nährmedien Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar (insgesamt 7.5 L) kultiviert. Die Kulturmedien wurden dann mit Eiswasser verdünnt und in einem Waring-Blender homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend einmal mit Petrolether und dreimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt, die Extrakte über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingengt. Die Ethylacetatextrakte wurden vereinigt.

Das Rohextrakt (8.6 g) säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt. Zuerst wurde als Elutionsmittel Petrolethter (1 L) genutzt, dem dann stufenweise Dichlormethan zugesetzt wurde. Anschließend wurde Dichlormethan verwendet, dem stufenweise Methanol zugesetzt wurde. Es wurden 6 Fraktionen gesammelt. Die ersten beiden enthielten hauptsächlich Fette (4.2 g). Aus der dritten Fraktion (500 mg) konnte der Naturstoffs **5451-1** (150 mg) mittels präparativer Schichtchromatographie isoliert werden. Als Laufmittel wurde CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> genutzt. Die vierte Fraktion (1.2 g) wurde mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (PE : E = 4 : 1) aufgetrennt. Es wurde Naturstoff **5451-2** (300 mg) als weißer, amorpher Feststoff gewonnen. Die Naturstoffe **5451-3** (8 mg) und **5451-4** (4 mg) konnten aus der fünften Fraktion durch präparativer Schichtchromatographie an RP-18 (H<sub>2</sub>O : Aceton = 7 : 3) isoliert werden.

#### 4.3.4.2. Verrucarin L-Acetat (**5451-1**)



Summenformel: C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>O<sub>10</sub>.–

Molmasse: 542.57 g/mol.–

Schmelzpunkt: 131-132 °C, Lit.<sup>[32]</sup>: 132-135 °C.–

R<sub>f</sub>: 0.67 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 98 : 2).–

Drehwert:  $[\alpha]_D^{20} = +32^\circ$  (c = 0.5, MeOH). Lit.<sup>[32]</sup>:  $29.7^\circ$  (c = 0.52, MeOH).–

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (log ε) = 270 nm (3.99).–

IR (Film):  $\tilde{\nu} = 2971 \text{ cm}^{-1}$ , 1724, 1652, 1440, 1372, 1243, 1186, 1072.–

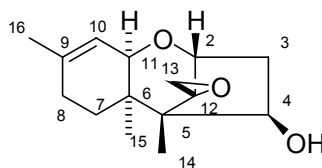
$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 0.81 (s, 3H, 14-H), 1.76 (s, 3H, 2''-H), 1.94 (s, 3H, 16-H), 2.16 – 2.24 (m, 3H, 3b-H, 7a-H, 7b-H), 2.28 (s, 3H, 12'-H), 2.44 – 2.60 (m, 3H, 3a-H, 4'a-H, 4'b-H), 2.85 (d,  $J_{13b,13a} = 3.9$  Hz, 1H, 13b-H), 3.11 (d,  $J_{13a,13b} = 3.9$  Hz, 1H, 13a-H), 3.80 (d,  $J_{11,10} = 5.3$  Hz, 1H, 11-H), 3.84 (d,  $J_{2,3b} = 5.0$  Hz, 1H, 2-H), 4.15 (ddd,  $J_{5'b,4'a} = 10.4$  Hz,  $J_{5'b,4'b} = 3.9$  Hz,  $J_{5'b,5'a} = 15.0$  Hz, 1H, 5b'-H), 4.22 (d,  $J_{15b,15a} = 12.5$  Hz, 1H, 15b-H), 4.48 (dt,  $J_{5'a,4'a} = 4.1$  Hz,  $J_{5'a,5'b} = 15.0$  Hz, 1H, 5'a-H), 4.54 (d,  $J_{15a,15b} = 12.5$  Hz, 1H, 15a-H), 5.20 (pt,  $J_{8,7a} = 3.1$  Hz,  $J_{8,7b} = 2.9$  Hz, 1H, 8-H), 5.70 (d,  $J_{10,11} = 5.3$  Hz, 1H, 10-H), 5.77 (s, 1H, 2'-H), 5.94 (dd,  $J_{4,3a} = 8.3$  Hz,  $J_{4,3b} = 4.4$  Hz, 1H, 4-H), 6.01 (d,  $J_{7',8'} = 15.6$  Hz, 1H, 7'-H), 6.09 (d,  $J_{10',9'} = 11.0$  Hz, 1H, 10'-H), 6.62 (pt,  $J_{9',10'} = 11.0$  Hz,  $J_{9',8'} = 11.5$  Hz, 1H, 9'-H), 8.01 (ddd,  $J_{8',7'} = 15.6$  Hz,  $J_{8',9'} = 11.5$  Hz,  $J_{8',10'} = 0.8$  Hz, 1H, 8'-H).–

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.0 (q, C-14), 17.1 (q, C-12'), 20.5 (q, C-2''), 21.0 (q, C-16), 26.4 (t, C-7), 34.8 (t, C-3), 40.2 (t, C-4'), 42.2 (s, C-6), 47.9 (t, C-13), 49.0 (s, C-5), 60.4 (t, C-5'), 64.4 (t, C-15), 65.3 (s, C-12), 67.0 (d, C-11), 68.8 (d, C-8), 74.8 (d, C-4), 78.9 (d, C-2), 117.7 (d, C-2'), 123.8 (d, C-10), 125.1 (d, C-10'), 127.8 (d, C-7'), 136.5 (s, C-9), 138.8 (d, C-8'), 139.9 (d, C-9'), 157.0 (s, C-3'), 165.5 (s, C-1'\*), 165.6 (s, C-6'\*), 165.8 (s, C-11'\*), 170.9 (s, C-1'').–

die mit \* gekennzeichneten Signale sind austauschbar!

MS (DCI,  $\text{NH}_3$ )  $m/z$  (%): 542 [ $\text{M}^+$ ], 482 (42), 340 (20), 228 (48), 210 (20), 198 (10) 111 (31).–

#### 4.3.4.3. Trichodermol (**5451-2**)



Summenformel:  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_3$ .–

Molmasse: 250.33 g/mol.–

Schmelzpunkt: 110 °C.–

$R_f$ -Wert: = 0.38 ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 97 : 3)

## Experimenteller Teil

---

UV(MeOH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 269 (3.04).–

Drehwert:  $[\alpha]_D^{20} = -30^\circ$  (c = 0.1, CHCl<sub>3</sub>).–

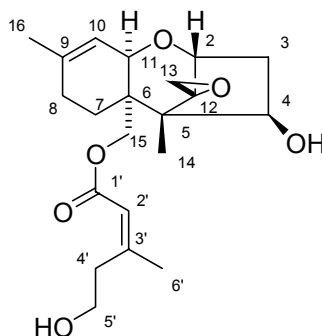
IR (Film):  $\tilde{\nu} = 3436 \text{ cm}^{-1}$ , 2965, 2934, 1439, 1383, 1279, 1191, 1072, 958.–

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.79$  (s, 3H, 14-H), 0.85 (s, 3H, 15-H), 1.70 (s, 3H, 16-H), 1.84 – 2.00 (m, 5H, 3b-H, 7-H, 8-H), 2.59 (dd,  $J_{3a,3b} = 15.6 \text{ Hz}$ ,  $J_{3a,4} = 7.5 \text{ Hz}$ , 1H, 3a-H), 2.80 (d,  $J_{13b,13a} = 3.9 \text{ Hz}$ , 1H, 13b-H), 3.09 (d,  $J_{13a,13b} = 3.9 \text{ Hz}$ , 1H, 13a-H), 3.50 (d,  $J_{11,10} = 5.5 \text{ Hz}$ , 1H, 11-H), 3.81 (d,  $J_{2,3b} = 5.3 \text{ Hz}$ , 1H, 2-H), 4.33 (dd,  $J_{4,3a} = 7.5 \text{ Hz}$ ,  $J_{4,3b} = 3.0 \text{ Hz}$ , 1H, 4-H), 5.38 (d,  $J_{10,11} = 5.5 \text{ Hz}$ , 1H, 10-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 6.6$  (q, C-14), 16.2 (q, C-15), 23.6 (q, C-16), 24.8 (t, C-7), 28.4 (t, C-8), 40.2 (s, C-6), 40.4 (t, C-3), 47.9 (t, C-13), 49.5 (s, C-5), 66.2 (s, C-12), 70.7 (d, C-11), 74.3 (d, C-4), 79.2 (d, C-2), 119.1 (d, C-10), 140.5 (s, C-9).–

MS (EI, 80 eV)  $m/z$  (%): 250 [ $M^+$ ] (15), 235 (16), 232 (17), 217 (11), 207 (38), 188 (39), 173 (100).–

### 4.3.4.4. Verrol (**5451-3**)



Summenformel: C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>6</sub>.–

Molmasse: 378.46 g/mol.–

Schmelzpunkt: der Naturstoff wurde als schwach gelbes Öl isoliert.–

$R_f$ -Wert = 0.43 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1).–

Drehwert:  $[\alpha]_D^{20} = -39^\circ$  (c = 0.1, CHCl<sub>3</sub>) .–

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 266 (2.89).–

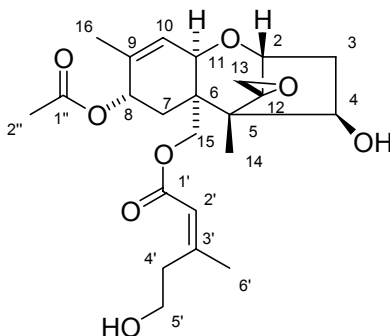
IR (Film):  $\tilde{\nu} = 3434 \text{ cm}^{-1}$ , 2964, 2948, 2916, 1713, 1650, 1434, 1223, 1147, 1076, 964.–

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.87$  (s, 3H, 14-H), 1.72 (s, 3H, 16-H), 1.73 – 2.10 (m, 5H, 3b-H, 7-H, 8-H), 2.21 (d,  $J_{6',2'} = 1\text{ Hz}$ , 3H, 6'-H), 2.42 (t,  $J_{4',5'} = 6.2 \text{ Hz}$ , 2H, 4'-H), 2.59 (dd,  $J_{3a,3b} = 15.6 \text{ Hz}$ ,  $J_{3a,4} = 7.6 \text{ Hz}$ , 1H, 3a-H), 2.82 (d,  $J_{13b,13a} = 3.9 \text{ Hz}$ , 1H, 13b-H), 3.13 (d,  $J_{13a,13b} = 3.9 \text{ Hz}$ , 1H, 13a-H), 3.65 (d,  $J_{11,10} = 5.3 \text{ Hz}$ , 1H, 11-H), 3.81 (t,  $J_{5',4'} = 6.2 \text{ Hz}$ , 2H, 5'-H), 3.84 (d,  $J_{2,3b} = 5.0 \text{ Hz}$ , 1H, 2-H), 3.94 (d,  $J_{15b,15a} = 12.4 \text{ Hz}$ , 1H, 15b-H), 4.19 (d,  $J_{15a,15b} = 12.4 \text{ Hz}$ , 1H, 15a-H), 4.56 (dd,  $J_{4,3a} = 7.6 \text{ Hz}$ ,  $J_{4,3b} = 3.0 \text{ Hz}$ , 1H, 4-H), 5.43 (d,  $J_{10,11} = 5.3 \text{ Hz}$ , 1H, 10-H), 5.75 (m, 1H, 2'-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta = 7.5$  (q, C-14), 19.2 (q, C-6'), 21.6 (t, C-7), 23.6 (q, C-16), 28.4 (t, C-8), 40.1 (t, C-3), 43.1 (s, C-6), 44.2 (t, C-4'), 48.0 (t, C-13), 49.4 (s, C-5), 60.4 (t, C-5'), 63.2 (t, C-15), 66.0 (s, C-12), 67.0 (d, C-11), 74.7 (d, C-4), 79.1 (d, C-2), 117.5 (d, C-2'), 118.8 (d, C-10), 141.3 (s, C-9), 158.0 (s, C-3'), 166.5 (s, C-1').–

MS (DCI, NH<sub>3</sub>)  $m/z$  (%): 379 [M+H<sup>+</sup>] (63), 335 (16), 284 (14), 266 (42), 249 (100), 231 (40), 148 (36), 130 (48), 113 (56).–

#### 4.3.4.5. Verrol-8-Acetat (**5451-4**)



Summenformel: C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>.–

## Experimenteller Teil

---

Molmasse: 436.50g/mol.–

Schmelzpunkt: 82 °C.–

$R_f$ -Wert = 0.41 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1).–

Drehwert:  $[\alpha]_D^{20} = -29^\circ$  (c = 0.06, MeOH).–

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 268 (2.89).–

IR (Film):  $\tilde{\nu} = 3450 \text{ cm}^{-1}$ , 2948, 2881, 1732, 1712, 1646, 1434, 1373, 1238, 1147, 1072, 1022.–

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 0.82$  (s, 3H, 14-H), 1.74 (s, 3H, 16-H), 1.94 (m, 1H, 3b-H), 1.98 (s, 3H, 2''-H), 2.06 (d,  $J_{7b,7a} = 15.2$  Hz, 1H, 7b-H), 2.21 (s, 3H, 6'-H), 2.29 (dd,  $J_{7a,7b} = 15.2$  Hz,  $J_{7a,8} = 5.4$  Hz, 1H, 7a-H), 2.41 (t,  $J_{4',5'} = 6.3$  Hz, 2H, 4'-H), 2.61 (dd,  $J_{3a,3b} = 15.9$  Hz,  $J_{3a,4} = 7.5$  Hz, 1H, 3a-H), 2.83 (d,  $J_{13b,13a} = 3.9$  Hz, 1H, 13b-H), 3.11 (d,  $J_{13a,13b} = 3.9$  Hz, 1H, 13 $\alpha$ -H), 3.77–3.83 (m, 4H, 2-H, 11-H, 5'-H), 4.06 (d,  $J_{15a,15b} = 12.5$  Hz, 1H, 15a-H), 4.23 (d,  $J_{15b,15a} = 12.5$  Hz, 1H, 15b-H), 4.59 (dd,  $J_{4,3a} = 7.5$  Hz,  $J_{4,3b} = 2.8$  Hz, 1H, 4-H), 5.23 (d,  $J_{8,7a} = 5.4$  Hz, 1H, 8-H), 5.68 (d,  $J_{10,11} = 5.5$  Hz, 1H, 10-H), 5.72 (s, 1H, 2'-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 7.7$  (q, C-14), 19.2 (q, C-6'), 20.7 (q, C-16), 21.4 (q, C-2''), 27.5 (t, C-7), 40.1 (t, C-3), 42.1 (s, C-6), 44.1 (t, C-4'), 47.9 (t, C-13), 49.3 (s, C-5), 60.5 (t, C-5'), 63.9 (t, C-15), 65.8 (s, C-12), 66.4 (d, C-11), 69.1 (d, C-8), 74.5 (d, C-4), 78.9 (d, C-2), 117.4 (d, C-2'), 124.1 (d, C-10), 137.0 (s, C-9), 158.4 (s, C-3'), 166.1 (s, C-1'), 171.3 (s, C-1'').–

MS (DCI, NH<sub>3</sub>)  $m/z$  (%): 472 [M + HCl] (100), 436 [M<sup>+</sup>] (51), 418 (23), 405 (18), 392 (15), 340 (22), 270 (17), 250 (12), 210 (18), 186 (21), 150 (31) 129 (38).–

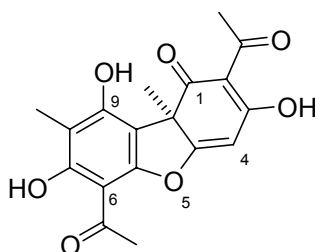


### 4.3.5. Naturstoffe aus Pflanzen

#### 4.3.5.1. Isolierung

Das Rohextrakt (1 g) wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgetrennt. Als Elutionsmittel diente ein Gradient von CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Petrolether (4 : 1) bis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, dem dann bis zu 10 % Methanol zugefügt wurde. Die unpolarste Fraktion bestand hauptsächlich aus Weichmacher (Diisobutylphthalat) in der zweiten war **P-1**. Der durch Kristallisation aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gereinigt wurde. In der polaren Fraktion befand sich hauptsächlich 4-Hydroxy-4-methyl-pentan-2-on, ein Kondensationsprodukt des Acetons.

#### 4.3.5.2. (+)-*R*-Usninsäure (**P-1**)



Summenformel: C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>.–

Molmasse: 344.09 g/mol.–

Schmelzpunkt: 202 °C.–

Kristallsystem: orthorhombisch.–

Raumgruppe: P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>

Dimensionen der Zelle:      a = 8.065 (2) Å  
    b = 19.038(3) Å  
    c = 20.347(3) Å.–

R<sub>f</sub>-Wert: 0.61 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).–

Drehwert: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 490 ° (c 0.2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) .–

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 331 (3.92), 295 (4.4).–

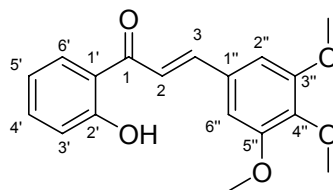
IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 2929  $\text{cm}^{-1}$ , 1693, 1631, 1543, 1450, 1284, 1191.–

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.81 (s, 3H, 15-H), 2.16 (s, 3H, 14-H), 2.71 (s, 3H, 11-H)\*, 2.73 (s, 3H, 13-H)\*, 6.03 (s, 1H, 4-H), 11.08 (s, 1H, 9-OH), 13.37 (s, 1H, 7-OH), 18.80 (s, 1H, 3-OH).–

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.0 (q, C-15), 28.3 (q, C-14), 31.7 (q, C-11)\*, 32.5 (q, C-13)\*; 59.5 (s, C-9b), 98.8 (d, C-4), 101.9 (s, C-2), 105.6 (s, C-6), 109.7 (s, C-9a), 155.6 (s, C-5a), 157.9 (s, C-9), 164.3 (s, C-7), 179.8 (s, C-4a), 192.1 (s, C-3), 198.5 (s, C-10), 200.8 (s, C-12), 202.2 (s, C-1).–

\* Zuordnung vertauschbar

#### 4.3.5.3. 1-(2'-Hydroxyphenyl)-3-(3'',4'',5''-trimethoxyphenyl)-2-propen-1-on (**P-2**)



Summenformel:  $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5$ .–

Molmasse: 344.33 g/mol.–

Schmelzpunkt: 154 °C.–

$R_f$ -Wert: 0.54 (PE : E = 4 : 1).–

UV (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 381 (4.05), 326 (4.09), 271(3.88).–

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 2938  $\text{cm}^{-1}$ , 1639, 1581, 1504, 1489, 1297, 1263, 1025.–

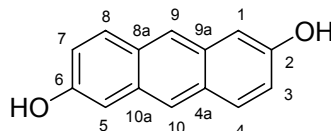
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  = 3.95 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.96 (s, 6H, 2  $\text{OCH}_3$ ), 6.92 (s, 2 H, 2''-H, 6''-H), 6.98 (m, 1H, 5'-H), 7.06 (dd,  $J_{3',4'} = 8.5$  Hz,  $J_{3',5'} = 1.0$  Hz, 1H, 3'-H), 7.53 (m, 1H, 4'-H), 7.56 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H, 2-H), 7.87 (d,  $J = 15.4$  Hz, 1H, 3-H), 7.92 (dd,  $J_{6',5'} = 8.1$  Hz,  $J_{6',4'} = 1.5$  Hz, 1H, 6'-H), 12.88 (s, 1H, OH).–

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 56.7 (q, 3''-, 5''- $\text{OCH}_3$ ), 61.4 (q, 4''- $\text{OCH}_3$ ), 106.4 (d, C-2'', C-6''), 119.0 (d, C-3'), 119.2 (d, C-5'), 119.6 (d, C-2), 120.4 (s, C-1'), 130.0 (d, C-6'), 130.5 (s, C-1''), 136.8 (d, C-4'), 141.2 (s, C-4''), 146.1 (d, C-3), 154.0 (s, C-3'', C-5''), 164.0 (s, C-2'), 193.9 (s, C-1).–

MS: (70eV, 200 °C)  $m/z$  (%): 314,  $[\text{M}^+]$  (37), 279 (9), 212 (39), 181 (68), 149 (48), 84 (78).–

## 4.4. Experimenteller Teil zur Naturstoffsynthese des Stemphyperlenols

### 4.4.1. 2,6-Dihydroxyanthracen (**32**)



In einem 1 L Kolben wird eine rötliche Suspension von 2,6-Dihydroxyanthrachinon (3.0 g, 13 mmol) in einer  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lsg (300 mL, 1 mol/L) mit Natriumborhydrid (6.0 g, 155 mmol) versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wird die rote Suspension mit halbkonz. HCl auf pH 1 angesäuert der grün-gelbe Feststoff abgesaugt und getrocknet. Es werden 2.4 g (91 %) 2,6-Dihydroxyanthracen **32** erhalten.

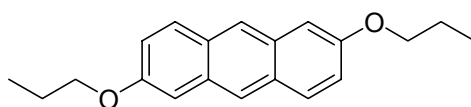
Schmelzpunkt: 270 °C (Zers.).–

$R_f$ -Wert: 0.4 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  5 %).–

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz, Aceton- $\text{d}_6$ ):  $\delta = 7.15$  (dd,  $J_{3,4(7,8)} = 9.0$  Hz,  $J_{3,1(7,5)} = 2.3$  Hz, 2H, 3-H, 7-H), 7.25 (d,  $J_{1,3(5,7)} = 2.3$  Hz, 2H, 1-H, 5-H), 7.85 (d,  $J_{4,3(8,7)} = 9.0$  Hz, 2H, 4-H, 8-H), 8.15 (s, 2H, 9-H, 10-H), 8.65 (s, 2H, OH).–

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz, Aceton- $\text{d}_6$ ):  $\delta = 107.5$  (d, C-1, C-5), 120.5 (d, C-3, C-7), 123.8 (d, C-9, C-10), 128.9 (s, C-4a, C-8a), 129.7 (d, C-4, C-8), 131.8 (s, C-10a, C-9a), 154.2 (s, C-2, C-6).–

#### 4.4.2. 2,6-Dipropoxyanthracen (**33**)



2,6-Dihydroxyanthracen (2.1 g, 10 mmol) wird mit  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2.8 g, 20 mmol), NaI (374 mg, 2.5 mmol) und 1-Brompropan (8.6 g, 70 mmol) in abs. DMF (150 mL) über Nacht bei 80 °C gerührt. Anschließend wird die braune Lösung abgekühlt und in Eiswasser (300 mL) gegossen. Der gelbe Niederschlag wird abfiltriert und getrocknet. Es werden 1.9 g Dipropoxyanthracen (65 %) erhalten.

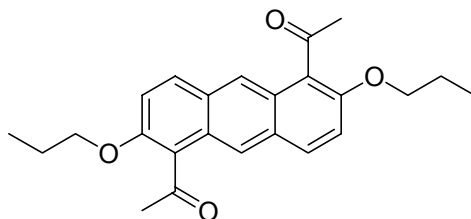
Schmelzpunkt: 235 °C.–

$R_f$ -Wert: 0.8 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).–

IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 2959$   $\text{cm}^{-1}$ , 2925, 1629, 1461, 1199.–

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.14$  (t,  $J_{13,12;16,15} = 7.4$  Hz, 6H, 13-H, 16-H), 1.94 (m, 4H, 12-H, 15-H), 4.11 (t,  $J_{11,12;14,15} = 6.6$  Hz, 4H, 11-H, 14-H), 7.16-7.20 (m, 4H, 1-H, 3-H, 5-H, 7-H), 7.87 (d,  $J_{4,3;8,7} = 10$  Hz, 2H, 4-H, 8-H), 8.21 (s, 2H, 9-H, 10-H).–

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 11.1$  (q, C-13, C-16), 23.0 (t, C-12, C-15), 69.8 (t, C-11, C-14), 104.9 (d, C-1, C-5), 121.2 (d, C-3, C-7), 124.5 (d, C-9, C-10), 129.1 (s, C-4a, C-8a), 129.6 (d, C-4, C-8), 131.6 (s, C-10a, C-9a), 156.3 (s, C-2, C-6).–

4.4.3. 1,5-Diacetyl-2,6-dipropoxyanthracen (**34**)

Zu einer Suspension von  $\text{AlCl}_3$  (3.2 g, 24 mmol) in abs.  $\text{CHCl}_3$  (20 mL) wird Acetylchlorid (3.4 mL, 48 mmol) getropft. Die Suspension wird zum Sieden erhitzt, bis eine gelbe Lösung entsteht. Zu dieser auf 0 °C abgekühlten Lösung tropft man innerhalb einer Stunde eine Lösung von 2,6-Dipropoxyanthracen (1.8 g, 6 mmol) in abs.  $\text{CHCl}_3$  (1 L). Die rote Lösung wird 3 h bei 0 °C gerührt und anschließend 10 h lang bei Raumtemperatur. Die rote Lösung wird dann mit 10 %iger  $\text{HCl}$  ( $4 \times 150$  mL) ausgeschüttelt, getrocknet und eingengt. Der dunkle Rückstand wird an Kieselgel mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  säulenchromatographisch gereinigt. Es werden 1.7 g (75 %) gelbes 1,5-Diacetyl-2,6-dipropoxyanthracen (**34**) erhalten.

Schmelzpunkt: 230 °C.–

$R_f$ -Wert: 0.4 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).–

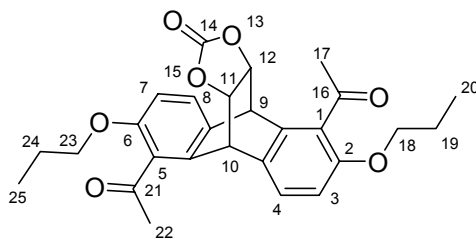
IR (KBr):  $\tilde{\nu} = 2965 \text{ cm}^{-1}$ , 2934, 2883, 1683, 1610, 1590, 1460, 1320, 1237, 1072 .–

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.11$  (t,  $J_{15,14;20,19} = 7.4$  Hz, 6H, 15-H, 20-H), 1.90 (m, 4H, 14-H, 19-H), 2.76 (s, 6H, 12-H, 17-H), 4.19 (t,  $J_{13,14;18,19} = 6.5$  Hz, 4H, 13-H, 18-H), 7.34 (d,  $J_{3,4;7,8} = 9.4$  Hz, 2H, 3-H, 7-H), 8.01 (d,  $J_{4,3;8,7} = 9.4$  Hz, 2H, 4-H, 8-H), 8.40 (s, 2H, 9-H, 10-H).–

$^{13}\text{C-NMR}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 11.0$  (q, C-15, C-20), 23.3 (t, C-14, C-19), 33.3 (q, C-12, C-17), 71.6 (t, C-13, C-18), 116.0 (d, C-3, C-7), 123.3 (d, C-9, C-10), 123.6 (s, C-1, C-5), 127.5 (s, C-10a, C-9a), 129.4 (s, C-4a, C-8a), 133.0 (d, C-4, C-8), 153.8 (s, C-2, C-6), 205.4 (s, C-11, C-16).–

EIMS (80 eV, 200 °C)  $m/z$  (%): 378 [ $\text{M}^+$ ] (100), 336 (8), 294 (36), 279 (34), 251 (9), 205 (8).–

4.4.4. 1,5-Diacetyl-2,6-dipropoxy-9,10,11,12-tetrahydro-9,10-[1,3]dioxolo[4,5]-ethenoanthracen-14-on (**35**)



1,5-Diacetyl-2,6-dipropoxyanthracen (1.51 g, 4.0 mmol) wird mit Vinylencarbonat (5 mL, mmol) acht Stunden lang bei 180 ° C am Rückfluß zum Sieden erhitzt. Anschließend wird das überschüssige Vinylencarbonat abdestilliert und der schwarze Rückstand mit Dichlormethan (4 × 25 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der Rückstand säulen-chromatographisch an Kieselgel mit Dichlormethan gereinigt. Es werden 1.11 g (60 %) wei-ßes Produkt erhalten.

Schmelzpunkt: 170-173 °C.–

R<sub>F</sub>-Wert: 0.5 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).–

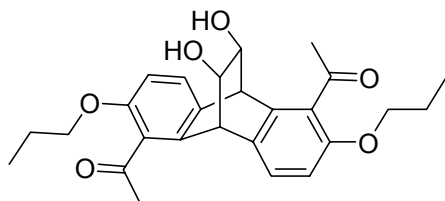
IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 2965 cm<sup>-1</sup>, 2934, 2872, 1801, 1677, 1584, 1455, 1279, 1269, 1046.–

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.04 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>), 1.81 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>), 2.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.95 (m, 2H, 2 × CH), 4.87 (m, 2H, 2 × CH), 6.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.32 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 11.1 (q), 22.8 (t), 22.9 (t), 32.7 (q), 32.8 (q), 43.7 (d), 44.3 (d), 70.6 (t), 70.8 (t), 76.3 (d), 76.4 (d), 110.8 (d), 111.0 (d), 128.7 (s), 129.0 (d), 129.1 (s), 129.7 (d), 129.9 (s), 130.1 (s), 136.2 (s), 137.6 (s), 154.6 (s), 156.4 (s), 156.6 (s), 203.3 (s), 203.8 (s).–

MS (EI 70 eV, 200 °C) *m/z* (%): 464 [M<sup>+</sup>] (21), 378 [M<sup>+</sup>-C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>O<sub>3</sub>] (100), 336 (15), 294 (18), 279 (14), 151 (9), 101 (8), 85 (13).–

4.4.5. 1,5-Diacetyl-2,6-dipropoxy-9,10-dihydro-9,10-ethano-11,12-anthracendiol  
(36)



Das Carbonat **35** (1.00 g, 2.2 mmol) wird in Ethanol (30 mL) gelöst. Es wird KOH (560 mg, 10 mmol) zu der Lösung gegeben, wobei sich diese rötlich färbt und die Lösung auf 60 °C erhitzt. Nach ca. 1 h ist die Reaktion beendet. Das Ethanol wird abdestilliert, der Rückstand in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) aufgenommen, mit 10 %iger HCl (2 × 10 mL) ausgeschüttelt, getrocknet und eingengt. Der Rückstand wird über eine kurze Säule flashchromatographisch mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gereinigt. Es werden 0.90 g (95 %) weißes Produkt erhalten.

Schmelzpunkt: 165-170 °C.–

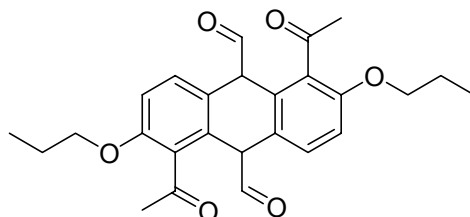
R<sub>F</sub>-Wert: 0.3 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 7 %).–

IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3423 cm<sup>-1</sup>, 2967, 2934, 2880, 1688, 1585, 1460 1281, 1253, 1069.–

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.04 (m, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>), 1.84 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>), 2.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.12 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, OH), 3.74 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, OH), 4.18–3.91 (m, 6H, 2 × OCH<sub>2</sub>, 2 × CH), 4.54 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, OCH), 4.61 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H, OCH), 6.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.75 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.23 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.36 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 11.1 (q), 11.2 (q), 22.90 (t), 22.94 (t), 32.8 (q), 32.9 (q), 47.4 (d), 48.2 (d), 67.7 (d), 68.0 (d), 70.5 (t), 70.6 (t), 109.7 (d), 127.6 (d), 128.6 (s), 129.5 (s), 129.7 (d), 132.1 (s), 132.3 (s), 138.7 (s), 139.6 (s), 155.5 (s), 155.7 (s), 204.0 (s), 206.1 (s).–  
MS (EI 80 eV, 220 °C) *m/z* (%): 378 [M<sup>+</sup>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>] (100), 336 (32), 294 (58), 251(16), 205 (18), 177 (12), 165 (13), 43 (38).–

4.4.6. 1,5-Diacetyl-2,6-dipropoxy-9,10-dihydro-anthracen-9,10-dicarbaldehyd (**37**)

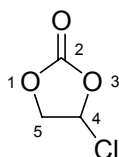


Das Diol **36** (850 mg, 1.94 mmol) wird in Dioxan (10 mL) gelöst. Zu dieser Lösung tropft man eine wässrige Lösung von NaIO<sub>4</sub> (457 mg, 2.13 mmol). Die gelbe Lösung wird 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird sie mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) versetzt und mit H<sub>2</sub>O (4 × 10 mL) ausgeschüttelt, getrocknet und das Lösungsmittel abdestilliert. Es werden 760 mg (90 %) Aldehyd **37** erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.08 (t, *J*<sub>15,14;21,20</sub> = 7.4 Hz, 6H, 15-H, 21-H), 1.85 (m, 4H, 14-H, 21-H), 2.63 (s, 6H, 12-H, 18-H), 4.04 (t, *J*<sub>13,12;19,18</sub> = 6.6 Hz, 4H, 13-H, 19-H), 5.08 (s, 2H, 9-H, 10-H), 7.01 (d, *J*<sub>3,4;7,8</sub> = 8.5 Hz, 2H, 3-H, 7-H), 7.41 (d, *J*<sub>4,3;8,7</sub> = 8.5 Hz, 2H, 4-H, 8-H), 9.54 (s, 2H, 16-H, 22-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 11.1 (q, C-15, C-21), 22.9 (t, C-14, C-20), 32.9 (q, C-12, C-18), 56.2 (d, C-9, C-10), 70.7 (t, C-13, C-19), 112.3 (d, C-3, C-7), 124.7 (s, C-1, C-5), 130.7 (s, C-4a, C-8a), 130.8 (s, C-10a, C-9a), 132.5 (d, C-4, C-8), 157.0 (s, C-2, C-6), 197.3 (d, C-16, C-22), 205.1 (s, C-11, C-17).–

4.4.7. 4-Chlor-[1,3]dioxolan-2-on (**40**)



Ethylencarbonat (40.0 g, 0.46 mol) und Sulfurylchlorid (60.1 g, 0.46 mol) werden in trockenem CCl<sub>4</sub> (250 mL) gelöst und in einem UV-Reaktor unter Bestrahlung mit einer 125 W UV-

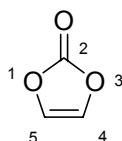


Lampe auf 70 °C erhitzt. Es tritt eine Gasentwicklung von SO<sub>2</sub> und HCl ein, welches in die Entlüftung des Abzuges geleitet wird. Nach 4 h wird die Reaktion gestoppt und die Reaktionslösung in einem Scheidetrichter gegeben. Bei der Abkühlung entstehen zwei Phasen. Die obere Phase enthält laut <sup>1</sup>H-NMR 65 % 4-Chlor-[1,3]dioxolan-2-on und 35 % Ethylencarbonat.

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 4.63 (dd, *J*<sub>5a,5b</sub> = 10.3 Hz, *J*<sub>5a,3</sub> = 1.9 Hz, 1H, 5a-H), 4.88 (dd, *J*<sub>5b,5a</sub> = 10.3 Hz, *J*<sub>5b,4</sub> = 5.6 Hz, 1H, 5b-H), 6.48 (dd, *J*<sub>4,5a</sub> = 1.9 Hz, *J*<sub>4,5b</sub> = 5.6 Hz, 1H, 4-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 74.5 (t, C-5), 86.1 (d, C-4), 153.2 (s, C-2).–

#### 4.4.8. Vinylencarbonat (**38**)



Das Gemisch aus 4-Chlor-[1,3]dioxolan-2-on und Ethylencarbonat (54.0 g) wird in abs. Diethylether (50 mL) am Rückfluß zum Sieden erhitzt und tropfenweise mit Triethylamin (27.2 g, 0.269 mol) versetzt. Die Lösung wird 40 Stunden lang zum Sieden erhitzt, wobei ein schwarzer Feststoff entsteht. Dieser wird mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 150 mL) extrahiert. Das Lösungsmittel wird abdestilliert und der schwarze Rückstand durch Kugelrohrdestillation gereinigt. Es wird ein weißer Feststoff erhalten (16.0 g, ca. 65 %).

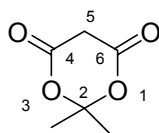
Schmelzpunkt.: 20-22 °C

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7,18 (s, 2H, 4-H, 5-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 132.1 (d, C-4, C-5), 153.9 (s, C-2).–

## 4.5. Experimenteller Teil zur Darstellung des Pyrancarbonsäureesters

### 4.5.1. 2,2-Dimethyl-[1,3]dioxan-4,6-dion (**42**)



Zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension von Malonsäure (52 g, 0.5 mol) und Acetanhydrid (60 mL, 0.64 mol) wird konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.5 mL) gegeben. Es wird eine klare Lösung erhalten, die man unter Rühren bei einer Innentemperatur von 15 °C tropfenweise mit Aceton (40 mL, 0.54 mol) versetzt. Anschließend lässt man 20 min lang bei Raumtemperatur rühren. Danach wird die Lösung über nacht auf –20 °C im Gefrierfach gekühlt. Die so erhaltene weiße Masse wird im Mörser zerkleinert, abgesaugt und erst mit eiskalter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 mol/L, 25 mL) und dann mit Eiswasser (30 mL) gewaschen und getrocknet. Die Kristalle werden aus Aceton umkristallisiert. Es werden 40 g (55 %) weiße Kristalle erhalten.

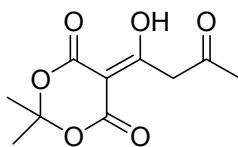
Schmelzpunkt: 93 – 95 °C (Lit.<sup>[77]</sup>: 90 – 96 °C).–

R<sub>f</sub>-Wert: 0.4 (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 9 : 1).–

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.81 (s, 6H, 7-H, 8-H), 3.63 (s, 2H, 5-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 28.0 (q, C-7, C-8), 36.6 (t, C-5), 106.7 (s, C-2), 163.4 (s, C-4, C-6).–

### 4.5.2. 5-(1'-Hydroxy-3'-oxobutyliden)-2,2-dimethyl-[1,3]dioxan-4,6-dion (**44**)



Zu einer auf 0 °C gekühlten Suspension von Meldrumsäure (8.64 g, 60 mmol) in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) wird Triethylamin (8.4 mL, 60 mmol) gegeben. Es entsteht eine gelbe Lösung, die tropfenweise mit Diketen (6.6 mL, 72 mmol) versetzt wird. Nach 30 min wird das Eisbad entfernt und die Lösung 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Reaktionslösung mit eiskalter, 10%iger HCl-Lösung (3 × 50 mL) ausgeschüttelt, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und auf die Hälfte des Volumens eingeeengt. Die entstehenden Kristalle werden abfiltriert und getrocknet. Es werden 13.00 g (95 %) rötliche Kristalle erhalten.

Schmelzpunkt: 70-72 °C.–

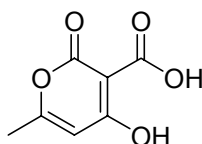
R<sub>f</sub>-Wert: 0.32 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 95 : 5).–

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.78 (s, 6H, 7-H, 8-H), 2.36 (s, 3H, 4'H), 4.17 (s, 2H, 2'-H), 15.0 (s, 1H, OH).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 27.3 (q, C-7, C-8), 31.1 (q, C-4'), 50.9 (t, C-2'), 93.8 (s, C-5), 106.0 (s, C-2), 161.2 (s, C-4)\*, 170.3 (s, C-6)\*, 189.3 (s, C-1'), 200.2 (s, C-3').–

\* Signale sind austauschbar!

#### 4.5.3. 4-Hydroxy-6-methyl-2-oxo-2H-pyran-3-carbonsäure(45)



Das Hydroxybutylidenderivat **44** (12.5 g, 55 mmol) wird in CHCl<sub>3</sub> (150 mL) gelöst und mit *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (570 mg, 3 mmol) versetzt und 3 h lang zum Sieden erhitzt. Anschließend wird die Lösung auf ein Drittel eingeeengt und auf 0 °C abgekühlt. Die entstehenden Kristalle werden abfiltriert und getrocknet. Es wird **45** (7.76 g, 83 %) in Form leicht rötlicher Kristalle erhalten.

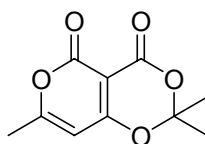
Schmelzpunkt: 126 °C.–

$R_f$ -Wert: 0.2 (CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 4 : 1).–

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 2.4 (s, 3H, 8-H), 6.2 (s, 1H, 5-H), 12.6 (br s, 1H, OH), 14.0 (br s, 1H, OH).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 21.0 (q, C-8), 90.9 (s, C-3), 102.6 (d, C-5), 166.7 (s, C-2), 168.4 (s, C-6), 171.7 (s, C-7), 178.6 (s, C-4).–

#### 4.5.4. 2,2,7-Trimethylpyrano[4,3-d][1,3]dioxin-4,5-dion (**46**)



Die Carbonsäure **45** (1.70 g, 10 mmol) wird in Essigsäureanhydrid (15 mL) suspendiert und mit Aceton (2.2 mL, 30 mmol) sowie *para*-Toluolsulfonsäure-Monohydrat (180 mg, 1 mmol) versetzt. Danach wird die Suspension erhitzt, bis sich eine klare Lösung bildet, die dann 12 h lang bei Raumtemperatur gerührt wird. Anschließend wird sie im Vakuum auf die Hälfte des Volumens eingengt und auf –30 °C abgekühlt. Die Kristalle werden abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Es wird **46** (1.43 g, 68%) in Form weißer Kristalle erhalten

Schmelzpunkt: 168 °C Zers.–

$R_f$ -Wert: 0.4 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 98 : 2).–

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 1.85 (s, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>), 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.47 (s, 1H, 8-H).–

<sup>13</sup>C-NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  = 21.3 (q), 25.8 (q), 99.5 (s), 108.9 (d), 156.4 (q), 172.4 (q), 172.9 (q).–

EIMS 80 (eV): 210 [M<sup>+</sup>](28), 169 (6), 153 (40), 152 (71), 124 (33), 84 (82), 69 (76), 43 (100).–

## **5. Abkürzungen**

Bio	Biomalzagar
CI	Chemische Ionisation
CoA	Coenzym A
COLOC	Correlation Spectroscopy via Long-Range Coupling
COSY	Correlation Spectroscopy
DC	Dünnschichtchromatographie
DCI	Direkte chemische Ionisation
DMF	Dimethylformamid
E	Essigsäureethylester
EI	Elektronenstoß-Ionisation
HMBC	Heteronuclear Multibond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
Lsg	Lösung
M/S	Malz-Soja-Weichagar
MeOH	Methanol
NBS	N-Bromsuccinimid
NOE	Nuclear Overhauser Effect
SC	Säulenchromatographie
PE	Petrolether

## **6. Literaturverzeichnis**

- [1] *CD Römpf* ( Hrsg.: J Falbe, M. Regitz), 9. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York **1995**.
- [2] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, 6. Aufl., Thieme, Stuttgart; New York **1985**, S. 151-172.
- [3] N. A. Campbell, *Biologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford **1997**, S. 625-641.
- [4] E. Müller, W. Loeffler, *Mykologie*, 4. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York **1982**.
- [5] *Lexikon der Biochemie* (Hrsg.: A. Fahlert-Müller), vol. 2, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin **2000**, S. 238-336.
- [6] H. Schlör, *Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel* (Hrsg.: R. Wegler), vol. 2, Springer, Berlin **1970**, p. 47.
- [7] J. Stetter, F. Lieb, *Angew. Chem.* **2000**(112), 1792-1812.
- [8] R. Carson, *Silent Spring*, Houghton Mifflin, Boston **1962**.
- [9] J. Stetter, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1993**(17), 346-370.
- [10] W. Mackenzie, *Agrochemical Service Update of the Countries Section*, vol. 12 **1998**, S. 4.
- [11] C. Hansch, H. Gao, *Chem. Rev.* **1997**(97), 2995-3059.
- [12] R. D. Cramer III, D. E. Patterson, J. D. Bunce, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**(110), 5959-5967.
- [13] H. Sauter, W. Steglich, T. Anke, *Angew. Chem.* **1999**(111), 1416-1438.
- [14] T. Anke, F. Oberwinkler, W. Steglich, G. Schramm, *J. Antibiot.* **1977**(30), 806-810.
- [15] U. Brandt, U. Haase, H. Schägger, G. von Jagow, *Wege zu neuen Produkten und Verfahren der Biotechnologie in DECHEMA Monographien* (Hrsg.: T. Anke, U. Onken), vol. 129, VCH, Weinheim **1993**, S. 9-25.
- [16] G. Schramm, *Dissertation*, Universität Bonn **1980**.
- [17] B. A. M. Schwalge, *Dissertation*, Universität Bonn **1986**.

- [18] M. J. Bushell, K. Beautement, J. M. Clough, P. DeFraine, V. M. Anthony, C. R. A. Godfrey (ICI) 178826, **23.04.86**.
- [19] D. C. Aldridge, J. F. Grove, W. B. Turner, *J. Chem. Soc. (C)* **1966**, 126-129.
- [20] W. B. Turner, D. C. Aldridge, *Fungal Metabolites II*, Academic Press, London **1983**, S. 55-223.
- [21] A. C. Whyte, J. B. Gloer, J. A. Scott, D. Malloch, *J. Nat. Prod.* **1996**(59), 765-769.
- [22] L. Colombo, C. Gennari, D. Potenza, C. Scolastico, F. Aragozzi, C. Merendi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, 2594-2597.
- [23] J. N. Collie, *Proc. Chem. Soc.* **1907**(91), 230.
- [24] D. O'Hagan, *The Polyketide Metabolites in Ellis Horwood Series in organic chemistry*, Ellis Horwood Limited, Chichester, Großbritannien **1991**.
- [25] A. J. Birch, R. J. English, R. A. Massy-Westropp, M. Slaytor, H. Smith, *J. Chem. Soc.* **1958**, 365.
- [26] M. John, *Dissertation*, Paderborn **1998**.
- [27] A. Fredenhagen, A. Kuhn, H. H. Peter, V. Cuomo, Guiliano U., *J. Antibiot.* **1990**(43), 655-660.
- [28] A. Fredenhagen, P. Hug, H. H. Peter, *J. Antibiot.* **1990**(43), 661-667.
- [29] V. Hellwig, J. Dasenbrock, D. Klostermeyer, S. Kroiß, T. Sindlinger, P. Spiteller, B. Steffan, W. Steglich, M. Engler-Loehr, S. Semar, T. Anke, *Tetrahedron* **1999**(55), 10101-10118.
- [30] G. W. Bushnell, Y-L. Li, G. A. Poulton, *Can. J. Chem.* **1984**(62), 2101-2106.
- [31] C. P. Gorst-Allmann, P. H. Van Rooyen, S. Wnuk, P. Golinski, J. Chelkowski, *S. Afr. J. Chem* **1986**(39), 116-117.
- [32] B. B. Jarvis, J. O. Midiwo, T. DeSilva, *J. Antibiot.* **1981**(34), 120-121.
- [33] S. Abrahamsson, Nilsson B., *Proc. Chem. Soc.* **1964**, 188.
- [34] B. B. Jarvis, V. M. Vrudhula, J. O. Midiwo, *J. Org. Chem.* **1983**(48), 2576-2578.
- [35] D. W. Anderson, R. M. Black, C. G. Lee, C. Pottage, R. L. Rickard, M. S. Sandford, T. D. Webber, N. E. Williams, *J. Med. Chem.* **1989**(32), 555-562.

- [36] P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products*, John Wiley & Sons, New York, Weinheim **1997**, S. 180-183.
- [37] L. Ruzicka, *Experienta* **1953**(9), 357-367.
- [38] J. H. Richards, Hendrickson J. B., *The Biosynthesis of Steroids, Terpenes and Acetogenins*, W. A. Benjamin, New York **1964**, S. 225-239.
- [39] D. E. Cane, *Chem. Rev.* **1990**(90), 1089-1103.
- [40] P. W. Suwarso, R. L. Gani, K. Krohn, M. John, *Eur. J. Org Chem.* **1999**, 1719-1721.
- [41] H. Hart, J. L. Reilly, *J. Chem. Edu* **1978**(55), 102-121.
- [42] M. S. Rao, P.S. Rao, H. Duddeck, G. Toth, B Blazas, *J. Nat. Prod.* **1998**(61), 1148-1149.
- [43] R. Rao, P. S. Rao, R. Raju, *Phytochemistry* **1987**(26), 2866.
- [44] S. Khalilullah, P. S. Rao, R. Raghava, *J. Nat. Prod.* **1992**(55), 229-231.
- [45] R. Chaturvedi, P. N. Patil, N. B. Mulchandani, *Indian J. Chem. Sec B* **1992**(31), 340-341.
- [46] H.-J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford **1996**, p. 119.
- [47] S. Ebel, *Synthetische Arzneimittel*, Verlag Chemie, Weinheim, New York **1979**.
- [48] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, VCH, Weinheim **1988**.
- [49] G. Bringmann, S. Busemann, K. Krohn, K. Beckmann, *Tetrahedron* **1997**(53), 1655-1664.
- [50] T. A. Halgren, *J. Comp. Chem* **1996**(17), 490-519.
- [51] T. A. Halgren, *J. Comp. Chem.* **1996**(17), 520-552.
- [52] T. A. Halgren, *J. Comp. Chem.* **1996**(17), 553-586.
- [53] T. A. Halgren, Nachbar R. B., *J. Comp. Chem* **1996**(17), 587-615.
- [54] T. A. Halgren, *J. Comp. Chem.* **1996**(17), 616-641.



- [55] G. Bringmann, S. Busemann, *Natural Product Analysis* ( Hrsg.: P. Schreier, M. Herderich, H.-U. Humpf, W. Schwab), 1. Aufl., Vieweg&Sohn, Braunschweig/Wiesbaden **1998**, S. 195-211.
- [56] H. A. Weber, N. C. Baenzinger, J. B. Gloer, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**(112), 6718-6719.
- [57] H. A. Weber, J. B. Gloer, *J. Org. Chem.* **1991**(56), 4355-4360.
- [58] S. B. Singh, D. L. Zink, J. M. Liesch, R. G. Ball, M. A. Goetz, C. Cascales, J. B. Gibbs, R. B. Lingham, *J. Org. Chem.* **1994**(59), 6296-6302.
- [59] S. Rodenhuis, *Semin. Can. Biol.* **1992**(3), 241.
- [60] S. K. Talapatra, S. C. D. Karmacharya, B. Talapatra, *Phytochemistry* **1988**(27), 3929-3932.
- [61] K. Krohn, U. Flörke, M. John, N. Root, K. Steingröver, H.-J. Aust, S. Draeger, B. Schulz, S. Antus, M. Simonyi, F. Zsila, *Tetrahedron* **2001**(57), 4343-4348.
- [62] Y. Lin, X. Wu, S. Feng, G. Jiang, J. Luo, S. Zhou, L. L. P. Vrijmoed, E. B. G. Jones, K. Krohn, K. Steingröver, F. Zsila, *J. Org. Chem* **2001**(66), 6252-6256.
- [63] Proceedings of the American Assosiation for Cancer Research **1994**, 35, 405.
- [64] K. Krohn, A. Michel, U. Flörke, Aust H.-J., S. Draeger, B. Schulz, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 1099-1108.
- [65] K. Krohn, K. Beckmann, U. Flörke, H-J. Aust, S. Draeger, B. Schulz, S. Busemann, G. Bringmann, *Tetrahedron* **1997**(53), 3101-3110.
- [66] G. Schlingmann, R. R. West, C. J. Pearce, G. T. Carter, *Tetrahedron Lett.* **1993**(34), 7225-7228.
- [67] G. Schlingmann, S. Matile, N. Berova, K. Nakanishi, G. T. Carter, *Tetrahedron* **1996**(52), 435-446.
- [68] C. Biele, *Dissertation*, Paderborn **1998**.
- [69] A. Arnone, G. Nasini, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1986**, 525-530.
- [70] D. W. Cameron, R. I. T. Cromartie, D. G. I. Kingston, G. B. V. Subramanian, *J. Chem. Soc.* **1964**, 4565-4569.
- [71] P. Boldt, *Chem. Ber.* **1967**(100), 1270-1280.

- [72] K. C. Murdock, R. G. Child, Y. Lin, J. D. Warren, P. F. Fabio, Lee V. J., P. T. Izzo, S. A. Lang, R. B. Angier, R. V. Citarella, R. E. Wallace, F. E. Durr, *J. Med. Chem.* **1982**, 505-518.
- [73] M. S. Newman, R. W. Addor, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**(77), 3789-3793.
- [74] J. Kang, Y. H. Kim, M. Park, C. H. Lee, W.-J. Kim, *Synth. Comm.* **1984**(14), 265-269.
- [75] P. Patel, G. Pattenden, *Tetrahedron. Lett.* **1985**(26), 4789-4792.
- [76] H. Venkataraman, J. K. Cha, *Tetrahedron Lett.* **1987**(28), 2455-2458.
- [77] L. F. Tietze, Th. Eicher, *Reaktionen und Synthesen im organisch-chemischen Praktikum und Forschungslaboratorium*, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York **1991**, S. 136.
- [78] Autorenkollektiv; *Organikum*, 18. Aufl., VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, **1990**, S. 290-291.
- [79] D. D. Perin, W. L. F. Armarego, D. R. Perin, *Purification of Laboratory Chemicals*, 2. Aufl., Pergamon Press, Oxford, New York **1985**.